

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1831

Hunajan botaanisen alkuperän määrittäminen hiilihydraattiprofilin avulla

Jarno Salin

Helsinki 2018

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	4
ABSTRACT	5
ESIPUHE	6
1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSTUTKIMUS	9
2.1 Hunajan koostumus	9
2.1.1 Hiilihydraatit	10
2.1.2 Proteiinit ja aminohapot	12
2.1.3 Entsyymit ja orgaaniset hapot	13
2.1.5 Vitamiinit sekä kivennäis- ja hivenaineet	14
2.1.6 Muut yhdisteet	15
2.2 Laji- ja sekahunajat	16
2.3 Hunajan alkuperä ja aitous	18
2.3.1 EU-tutkimus hunajaväärennöksistä	18
2.3.2 Hiilihydraattien lisääminen hunajaan	19
2.3.3 Epäsuorat hunajaväärennökset	21
2.3.4 Värimuutokset ja lämmityksen vaikutukset	23
2.3.5 Hunajan botaaninen alkuperä ja hiilihydraattiprofiilin hyödyntäminen	23
2.3.6 NMR-tekniikka ja hunajan hiilihydraattiprofiilin määrittäminen	28
2.4 HPAEC-PAD ja hiilihydraattianalytiikka	30
2.5 PCA:n käyttö lajihunajien erottamiseksi	33
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	35
3.1 Tutkimuksen tavoite	35
3.2 Materiaalit ja menetelmät	35
3.2.1 Laitteisto	35
3.2.2 Reagenssit ja ajoliuokset	36
3.2.3 Näytteet ja niille suoritettut esitutkimukset	36
3.2.4 Näytteiden käsittely	40
3.2.5 Standardit	40
3.2.6 Menetelmän toimivuuden määrittäminen	41
3.2.7 Menetelmän kehittämisen vaiheet	43
3.2.8 Hiilihydraattiprofiilien määrittäminen ja PCA-mallien luominen	46
3.3 Tulokset	47
3.3.1 Hiilihydraattien määrittämiseksi valittu menetelmä	47
3.3.2 Kromatografinen erottuminen ja menetelmän toimivuus	47
3.3.3 Näytteissä esiintyneet hiilihydraatit	52
3.3.4 Lajihunajien hiilihydraattiprofiileille tyypilliset piirteet	58

3.3.5 HMF-määrittäminen menetelmän avulla	59
3.3.6 PCA:n avulla tapahtuva lajihunajien erottaminen toisistaan	59
3.4 Pohdinta	63
3.4.1 Menetelmän kehitys	63
3.4.2 Menetelmän toimivuus	65
3.4.3 Varastoinnin ja hunajan satovuoden vaikutus näytteissä	67
3.4.4 Lajihunajien hiilihydraattiprofiileille tyypillisiä piirteitä	68
3.4.5 PCA-malleissa havaitut erot lajihunajien välillä	69
3.4.6 Lajihunajien väliset erot ja näytteiden alkuperän arviointi	71
3.4.7 Vertailu muihin tutkimuksiin	73
4 PÄÄTELMÄT	77
LÄHDELUETTELO	78

TIIVISTELMÄ

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Jarno Salin			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Hunajan botaanisen alkuperän määrittäminen hiilihydraattiprofiilin avulla			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarvikekemia			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma		Aika — Datum — Month and year Maaliskuu 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 82
Tiivistelmä — Referat — Abstract Hunaja on mehiläisten kukista tai hyönteisten eritteistä keräämästä medestä valmistamaa viskoosia ravintoliuosta. Elintarvikekäyttöön hunaja kerätään kennoissa mehiläispesistä, minkä jälkeen se lingotaan ja purkitaan. Hunaja koostuu pääasiassa hiilihydraateista ja vedestä, mutta se sisältää myös pienissä pitoisuuksissa paljon muita yhdisteitä kuten proteiineja, vitamiineja, orgaanisia happoja ja fenolisia yhdisteitä. Suurin osa hunaja hiilihydraateista on fruktoosia ja glukoosia, mutta näiden lisäksi mukana on huomattavasti pienempinä pitoisuuksina lukuisia di-, tri- ja oligosakkarideja. Hunajan koostumus ja sitä kautta hiilihydraattiprofiili voivat vaihdella merkittävästi riippuen alkuperäkasvilajista, maaperästä, ilmastosta ja muista kasvuolosuhteista. Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää pulssiamperometriseen detektioon yhdistetty anioninvaihtokromatografiamenetelmä (HPAEC-PAD-menetelmä), jonka avulla voitiin määrittää hiilihydraattiprofiilit näytteenä olleille kotimaisille laji- ja sekahunajille. Lisäksi pyrittiin tutkimaan eri kasvitieteellistä (botaanista) alkuperää olleiden hunajien hiilihydraattiprofiilien välisiä eroja pääkomponentti-analyysin (PCA) avulla.			
Työssä käytetty laitteisto koostui kromatografisesta erotusmoduulista, elektrokemiallisesta detektorista sekä Dionex CarboPac PA1 -kolonnista. Ajoliuoksina käytettiin Milli-Q-vettä, 100 mM natriumhydroksidiliuosta sekä 100 mM natriumhydroksidiliuosta, jossa oli mukana 0,5 M natriumasetaattipuskuria. Näytteinä toimi 33 kotimaista laji- ja sekahunajaa, jotka olivat 12:ta eri botaanista alkuperää. Näytteitä punnittiin kolmena rinnakkaisnäytteenä n. 0,5 g 50 ml:n mittapulloihin ja pullot täytettiin merkkiin Milli-Q -vedellä. Tästä liuoksesta tehtiin Milli-Q-veteen 1:5- ja 1:200-laimennokset, jotka suodatettiin 0,45 µm:n PVDF-suodattimen läpi ajopulloihin ennen analyysiä. Näytteissä olleet hiilihydraatit tunnistettiin 16:tta eri hiilihydraattia sisältäneen standardiseoksen avulla. Hiilihydraattien kvantitointi tapahtui kromatogrammeista saatujen piikkien korkeuksien avulla.			
Näytteistä pystyttiin erottamaan 10 eri hiilihydraattia hiilihydraattiprofiilin määrittämistä varten. Suurin osa näytteistä sisälsi fusitolia, fukoosia, glukoosia, fruktoosia, turanoosia, nigeroosia ja maltoosia. Osa näytteistä sisälsi myös trehaloosia ja ramnoosia. Vain yksi mesikastehunajanäyte sisälsi raffinoosia. Lisäksi suurin osa näytteistä sisälsi myös meleitsitoosia/isomaltoosia, kojibioosia/1-kestoosia sekä β-gentiobioosia, mutta näiden hiilihydraattien kvantitointi ei ollut mahdollista yhdisteiden huonon resoluution vuoksi. Kvantitoitujen hiilihydraattien pitoisuudet vaihtelivat paljon jopa samaa lajihunajaa olleiden näytteiden välillä. PCA:n perusteella mesikastehunaja erosi selvästi muista lajihunajista. Luotu PCA-malli selitti n. 64 % koko aineiston varianssista. Toisessa PCA-mallissa, josta oli poistettu eronneet mesikastenäytteet, etenkin jättipalsami-, horsma- ja hillahunajat pystyttiin erottamaan muista lajihunajista omiksi ryhmikseen. Tämä malli selitti n. 40 % koko aineiston varianssista. Suuri osa eri lajihunajista muodosti kuitenkin molemmissa malleissa joukon, josta ei pystytty löytämään selkeitä eroja siihen kuuluneiden lajihunajien välillä. Lisäksi muutaman näytteen kohdalla heräsi kysymys näytteen todellisesta botaanisesta alkuperästä.			
Kehitetty menetelmä soveltui erityisesti mesikastehunajan erottamiseen muista tutkituista lajihunajista. Muiden lajihunajien väliset erot eivät olleet aivan yhtä selkeitä, vaikka osa näistä lajihunajista osoitti merkkejä yksilöllisestä hiilihydraattiprofiilista. Tutkimuksessa käytetty näytemäärä oli toisaalta melko pieni. Tämän vuoksi saatujen tulosten perusteella ei voitu vielä tehdä vahvoja johtopäätöksiä eri lajihunajien hiilihydraattiprofiilien välisistä eroista. Jatkotutkimus suuremmalla näytteiden lukumäärällä on tarpeen, jotta tutkimuksessa löydetyt erot voidaan varmentaa.			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Hunaja, alkuperä, hiilihydraatti, HPAEC-PAD, PCA			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1831. Julkinen 6.3.2018.			

ABSTRACT

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Food and Nutrition	
Tekijä — Författare — Author Jarno Salin			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Determining the botanical origin of honey using carbohydrate profile			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Chemistry			
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis		Aika — Datum — Month and year March 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 82
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Honey is viscose nutrient solution which is produced by honey bees from the nectar of the plants or excretions of plant sucking insects. For food use honey is collected from beehives in honeycombs which are centrifuged and the separated solution is canned. Honey consists mainly of carbohydrates and water but there are also in small amounts numerous other compounds such as proteins, vitamins, organic acids and phenolic compounds. Most of the carbohydrates in honey are fructose and glucose but also a great number of di-, tri-, and oligosaccharides can be found in smaller amounts. Composition of honey and therefore the carbohydrate profile can vary greatly depending on the honeys botanical origin, soil, climate and other factors affecting the growing environment. The goal of this study was to develop a chromatographic method using high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) to determine carbohydrate profiles for domestic unifloral and mixed honeys. Principal component analysis (PCA) was used to investigate the differences in determined carbohydrate profiles.</p> <p>Equipment used in this study consisted of chromatographic separations module, electrochemical detector and Dionex CarboPac PA1 column. Milli-Q water, 100 mM sodium hydroxide solution and 100 mM sodium hydroxide solution with 0,5 M sodium acetate buffer were used as eluents. 33 domestic unifloral and mixed honeys of 12 different botanical origins were used as samples. Approximately 0,5 g of samples were weighed in three replicates to 50 ml volumetric flasks which were filled with Milli-Q water. From these solutions 1:5 and 1:200 dilutions were made and they were filtered to HPLC vials through 0,45 µm PVDF-filter before analysis. Carbohydrates in samples were identified using a standard mixture with 16 carbohydrate standards. Carbohydrates were quantified from chromatograms using the height of detected peaks.</p> <p>Ten different carbohydrates could be separated from the honey samples for determination of carbohydrate profiles. Most of the samples contained fucitol, fucose, glucose, fructose, turanose, nigerose and maltose. Some samples contained also trehalose and rhamnose. Raffinose was quantitated from one honeydew sample. In addition melezitose/isomaltose, kojibiose/1-kestose and β-gentiobiose were detected in samples but quantitation of these carbohydrates could not be done because of poor resolution. Concentrations of the quantitated carbohydrates varied greatly even between honey samples of same botanical origin. PCA revealed that honeydew honeys differed clearly from other unifloral honeys according to their carbohydrate profiles. The PCA model explained circa 64 % of variance in the whole dataset. Differed honeydew samples were removed from second PCA model. In this model Himalayan Balsam, cloudberry and willowherb honeys could be separated as individual groups from the other unifloral honeys. This model explained circa 40 % of variance in the whole dataset. However in PCA most of the unifloral honeys formed a group where no clear differences could be assessed between samples of different botanical origin. Moreover some samples aroused a suspicion over their actual botanical origin.</p> <p>The developed method could be used to separate honeydew honey samples from blossom honey samples. The differences among other unifloral honey samples were not clear although some of the unifloral honeys showed some signs of unique carbohydrate profile. On the other hand the number of samples used in this study was quite small. Therefore strong conclusions about the differences among carbohydrate profiles of different unifloral honeys could not be made. For future research greater number of samples is required in order to verify the potential differences found in this study.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Honey, origin, carbohydrate, HPAEC-PAD, PCA			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT series 1831. Public 6.3.2018.			

ESIPUHE

Tämä maisterin tutkielma tehtiin Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) toimeksiannosta. Työn kokeellinen osuus suoritettiin Eviran laboratoriossa 5.10.2016–29.3.2017. Työn ohjaajina toimivat Eviran erikoistutkija Helena Pastell sekä Helsingin yliopiston lehtori Anna-Maija Lampi. Työn vastuuprofessorina toimi professori Vieno Piironen.

Haluan kiittää kaikkia työn ohjaajia, Eviran henkilökuntaa sekä kaikkia muita työn valmistumisessa auttaneita tuesta ja avusta.

Helsingissä maaliskuun 6. päivänä 2018.

Jarno Salin.

1 JOHDANTO

Codex Alimentarius määrittelee hunajan mehiläisten (*Apis mellifera*) tuottamaksi makeaksi aineeksi, joka valmistetaan joko elävien kasvien tuottamasta medestä tai kasveissa elävien hyönteisten eritteistä (Codex Alimentarius 2001). Mehiläiset muokkaavat keräämänsä meden koostumusta omien eritteidensä avulla, minkä jälkeen muokattu mesi kuivataan ja varastoidaan hunajakennoihin kypsymistä varten. Kasveista kerätystä medestä valmistettua hunajaa kutsutaan kukkais- tai mesihunajaksi, kun taas hyönteisten, kuten kirvojen, eritteistä valmistettua hunajaa kutsutaan mesikastehunajaksi.

Hunaja koostuu lähes kokonaan vedestä ja erilaisista hiilihydraateista, pääosin fruktoosista ja glukoosista, joiden lisäksi hunajassa on mm. orgaanisia happoja, entsyymejä sekä hunajan keruun mukana tulleita kiinteitä partikkeleita (Codex Alimentarius 2001). Hunajan väri voi vaihdella lähes värittömästä hyvin tummanruskeaan. Myös hunajan olomuoto voi vaihdella juoksevasta lähes kiinteään ja se voi olla osittain tai kokonaan kiteytynyttä. Lisäksi hunajan maku ja aromi vaihtelevat riippuen siitä, mistä kasvista hunajan mesi on pääosin kerätty.

Hunajaa on sen suuresta hiilihydraattipitoisuudesta huolimatta pidetty perinteisesti terveystuotteena, minkä vuoksi sitä on käytetty tuhansien vuosien ajan luonnonlääkkeenä (Bogdanov ym. 2008). Nykytutkimusten valossa hunajalla on osoitettu olevan mm. antimikrobisia, antiviraalisia, antioksidatiivisia sekä anti-inflammatorisia vaikutuksia. Lisäksi hunajan on esitetty edistävän esimerkiksi suun, sydämen, verisuonten ja suoliston terveyttä. Näiden terveysvaikutusten arvellaan johtuvan mm. hunajassa olevista entsyymeistä, flavonoideista ja fenolisista yhdisteistä. Nämä hunajaan yhdistetyt terveysvaikutukset lisäävät kuluttajien kiinnostusta hunajaa kohtaan.

Hunajat voidaan luokitella myös niiden tuotantotavan tai olomuodon mukaan (EY 2002). Kaikkein vähiten prosessoituna hunajana voidaan pitää kennohunajaa, jossa hunajaa ei eroteta lainkaan mehiläispesässä varastoimiseen käytetyistä kennoista. Palahunajaksi tai leikatuksi kennohunajaksi kutsutaan hunajaa, jossa hunajakennon alkuperäinen rakenne on osittain rikottu, mutta se sisältää vielä yhden tai useamman palan kennoa. Valutetussa hunajassa hunaja erotetaan kennoista valuttamalla, kun taas lingotussa hunajassa erottamiseen käytetään voimakkaampaa linkouskäsittelyä. Puristettu hunaja on ainoa hunajan muoto, jossa voidaan käyttää mietoa lämpökäsittelyä (enintään +45 °C) edesauttamaan hunajan puristamista ulos kennoista. Edellä mainittujen lisäksi on vielä

suodatettu hunaja, jossa hunajasta poistetaan suodattamalla epäorgaanisia ja orgaanisia aineita. Suodatuksen myötä poistuu myös merkittävä osa hunajaan mehiläisten mukana kulkeutuvasta siitepölystä, mikä voi mm. vaikeuttaa hunajan alkuperän tunnistamista (Salonen 2011). Kuluttajille myytävät hunajat voivat olla yhdistelmiä erilaisista käsittelytavoista. Hunaja voi esimerkiksi olla sekä lingottua että suodatettua.

Hunajaksi saa kutsua vain sellaista hunajaa, johon ei ole lisätty eikä siitä ole poistettu mitään (EY 2002). Tämä lisäyskielto koskee sekä elintarvikkeita ja mausteita että elintarvikelisiä aineita. Mustikalla maustettua hunajaa ei siis saa kutsua mustikkahunajaksi, vaan siitä on käytettävä esimerkiksi nimitystä ”mustikalla maustettu hunajavalmiste”. Hunajassa pitää myöskin olla mahdollisimman vähän sen koostumukselle vieraita orgaanisia ja epäorgaanisia aineita, se ei saa olla käynyttä tai edes alkavassa käymistilassa eikä sen happamuutta saa keinotekoisesti muuttaa. Ainoa poikkeus lisäyksen ja poistamisen kieltävään sääntöön on suodatettu hunaja, jossa suodatuksen myötä hunajasta poistuu mm. siitepölyä. Siitepölyn tarkoituksellinen poistaminen sellaisenaan on kuitenkin kiellettyä.

Taloushunajaksi kutsutaan hunajaa, joka on tarkoitettu teollisuuskäyttöön tai osaksi muiden elintarvikkeiden jatkojalostusta (EY 2002). Taloushunajaa koskevat määräykset ovat selvästi lievemmit verrattuna kuluttajille sellaisenaan myytävään hunajaan, sillä taloushunajassa ei ole rajoitteita hunajan käymisasteelle eikä sen ylikuumennusta ole kielletty. Taloushunajassa saa lisäksi olla mukana vieraita hajuja ja makuja, joiden esiintyminen hunajassa tulee muuten pitää mahdollisimman vähäisenä.

Suurin osa EU:ssa tuotetusta hunajasta on ei-ammattimaisten mehiläistarhaajien tuottamaa (Aries ym. 2016). Vuonna 2015 hunajaa tuotettiin EU-alueella noin 250 000 tonnia, mikä tekee EU:sta Kiinan jälkeen maailman toiseksi suurimman hunajantuotantoalueen. Muita suuria hunajantuottajia maailmalla ovat mm. Turkki, Ukraina ja Yhdysvallat. EU:ssa Romania, Espanja ja Saksa ovat kolme suurinta tuottajamaata. Huolimatta vuosittain nousevista tuotantomääristä aiheuttavat mehiläisten lisääntyneet terveysongelmat sekä kasvavat ympäristöongelmat jatkuvia haasteita hunajan tuotannolle (Potts ym. 2016). Vaikka EU onkin maailman toiseksi suurin hunajan tuotantoalue, tuodaan jopa 40 % EU-alueella kulutettavasta hunajasta sen ulkopuolelta, pääosin juuri Kiinasta (Aries ym. 2016). Siinä missä EU:ssa massatuotetun sekahunajan hinta on noin 3,78 €/kg, on vastaava hinta Kiinassa tuotetulle hunajalle alle puolet tästä (1,64 €/kg). Tämä ero vaikeuttaa merkittävästi EU:n hunajantuottajien kilpailua ulkopuolisten kilpailijoiden kanssa.

Tämän työn kirjallisuustutkimuksen tavoitteena oli selvittää, millainen on hunajan koostumus, mitkä tekijät koostumukseen vaikuttavat sekä miten eri kasvitieteellistä (botaanista) alkuperää olevat lajihunajat eroavat toisistaan. Lisäksi selvitettiin, miten hunajan botaanisen alkuperän määrittämistä on kirjallisuudessa tutkittu, millä eri tavoin hunajaa voidaan väärentää ja millä keinoin näitä hunajaväärennöksiä voidaan tutkia. Työn kokeellisessa tutkimuksessa tavoitteena oli kehittää pulssiamperometriseen detektioon yhdistetty anioninvaihtokromatografiamenetelmä (HPAEC-PAD), jonka avulla näytteinä olleiden suomalaisten lajihunajien hiilihydraattiprofiilit pystyttiin määrittämään. Hiilihydraattiprofiilien välisiä eroja pyrittiin tutkimaan käyttäen tilastollisia monimuuttujamenetelmiä kuten pääkomponenttianalyysiä (PCA).

2 KIRJALLISUUSTUTKIMUS

2.1 Hunajan koostumus

Hunajalle on erittäin vaikea määrittää yhtä yleispätevää koostumusta, sillä hunajan botaaninen alkuperä, maantieteellinen tuotantoalue, ilmasto ja jopa hunajan valmistaneiden mehiläisten laji vaikuttavat niin hunajan koostumukseen kuin sen aistinvaraisiin ominaisuuksiin (Tornuk ym. 2013; Escuredo ym. 2014). Lisäksi varastoinnin aikana hunajassa tapahtuu monia sen koostumukseen vaikuttavia reaktioita kuten käymistä (fermentaatiota) ja hapettumista, minkä lisäksi hunajan lieväkin lämpökäsittely voi muuttaa hunajan ominaisuuksia (Moreira ym. 2010). Esimerkiksi hunajan hydroksimetyyli-furfuraalipitoisuus (HMF-pitoisuus) voi nousta lämpökäsittelyn tai pitkäaikaisen varastoinnin myötä aiheuttaen ei-toivottuja muutoksia hunajan aistittavassa laadussa (Tornuk ym. 2013). Suurina pitoisuuksina HMF voi jopa tehdä hunajasta myrkyllistä. Fermentaatoriski kasvaa hunajassa etenkin silloin, jos se kerätään liian aikaisin (Zábrodská ja Vorlová 2015). Tämä johtuu alikypsyneen hunajan suuremmasta vesipitoisuudesta, joka luo fermentaatiolle suotuisimmat olosuhteet. Myös varastointitilojen suuri kosteuspitoisuus sekä suuri varastointilämpötila lisäävät hunajan fermentaatoriskiä.

EU-direktiivissä (2002) on annettu joillekin yhdisteille selvät hunajan koostumusta koskevat raja-arvot. Glukoosin ja fruktoosin yhteispitoisuuden tulee kukkaishunajissa olla vähintään 60 g/100 g, kun taas mesikastehunajissa tai sitä sisältävissä hunajasekoituksissa

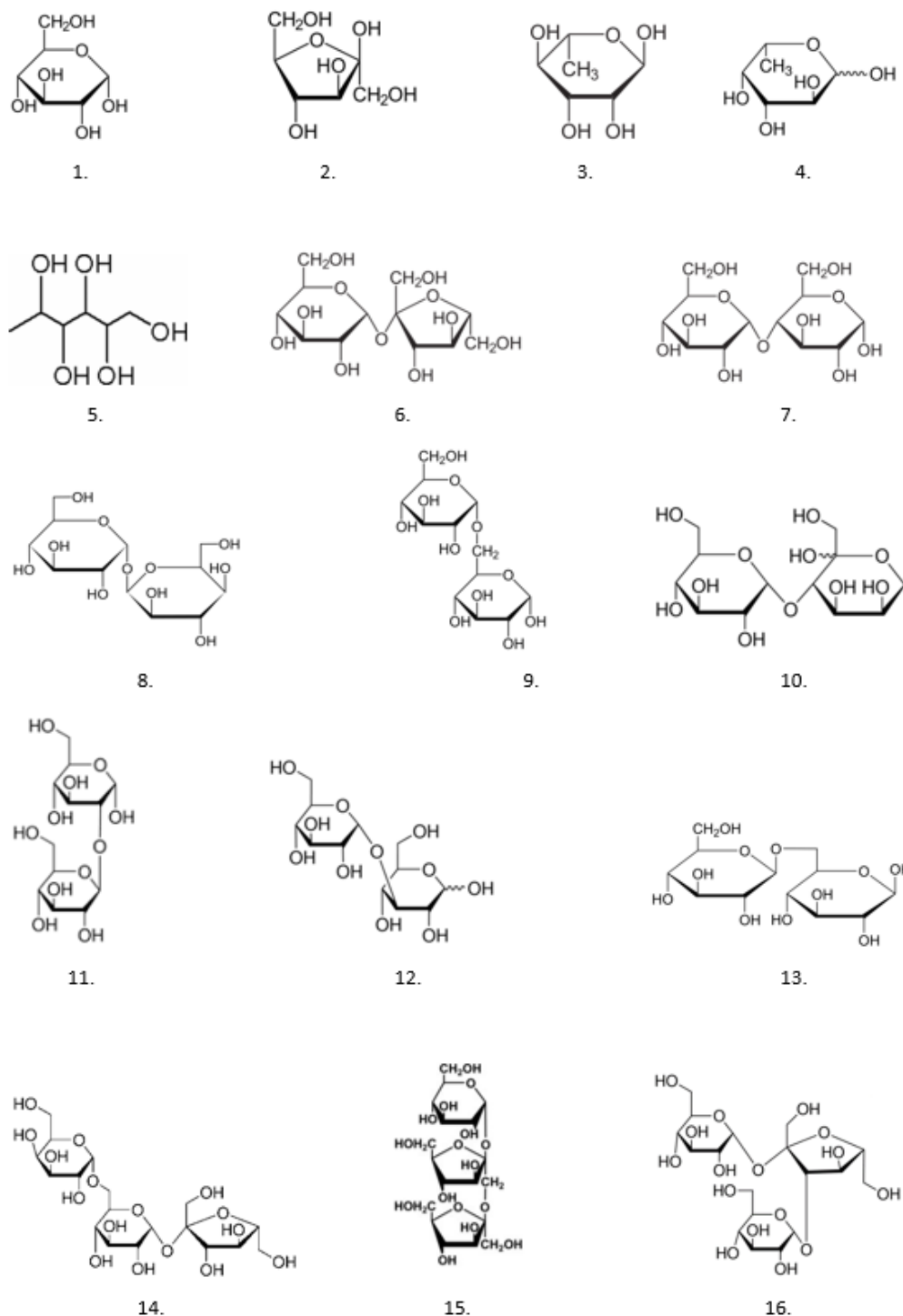
yhteispitoisuuden tulee olla vähintään 45 g/100 g. Sakkaroosipitoisuuden tulee muutamia yksittäisiä lajihunajapoikkeuksia lukuun ottamatta olla hunajassa alle 5 g/100 g. Hunajan kosteuspitoisuus ei saa olla yli 20 %, sillä tätä suuremmat pitoisuudet lisäävät hunajan fermentaatoriskiä. Poikkeuksena tähän on kanervahunaja, jossa kosteusprosentti saa olla enimmillään 25. Veteen liukenemattomien kiinteiden aineiden pitoisuus tulee puristettua hunajaa lukuun ottamatta olla alle 0,1 g/100 g. Sähkönjohtavuuden tulee pääosin olla alle 0,8 mS/cm, mihin poikkeuksia ovat mesikastehunaja ja sitä sisältävät hunajaseokset, joiden sähkönjohtavuuden tulee olla vähintään edellä mainittu 0,8 mS/cm. Lisäksi on muutamia lajihunajia, kuten kanervahunaja, joille ei ole määritelty vähimmäis- tai enimmäisjohtavuutta. Vapaan hapon määrä tulee hunajassa olla taloushunajaa lukuun ottamatta alle 50 mekv/kg. Lisäksi hunajan diastaasiaktiivisuuden vähimmäisraja (Schaden asteikolla vähintään 8) sekä HMF:n enimmäispitoisuus (40 mg/kg) on muutamia lajihunajapoikkeuksia lukuun ottamatta määritelty direktiivissä. Voikukkahunajassa diastaasiaktiivisuus on esimerkiksi luonnostaan keskiarvoa pienempi (3-8) (Salonen 2011). EU-lainsäädäntö ei ole asettanut raja-arvoa hunajan invertaasiaktiivisuudelle, mutta suomalaisessa hunajassa invertaasiaktiivisuuden tulisi olla yli 35, sillä tätä alhaisemmat arvot ovat indikaattori hunajan voimakkaasta lämpökäsittelystä (SML 2017). Invertaasi- ja diastaasiaktiivisuus tulee mitata tuoreista näytteistä, sillä molempien entsyymien aktiivisuus tavallisesti pienenee varastoinnin aikana (Persano Oddo ym. 1999).

2.1.1 Hiilihydraatit

Hunaja sisältää paljon erilaisia mono-, di- ja oligosakkarideja, joista noin 75 % on fruktoosia ja glukoosia (Da Silva ym. 2016). Erilaisia disakkarideja on hunajan hiilihydraateista 10–15 %, minkä lisäksi hunajassa on pieniä määriä lukuisia erilaisia tri- ja oligosakkarideja. Hunajassa esiintyvät di-, tri- ja oligosakkaridit ovat pääosin erilaisia glukoosi- ja fruktoosimonomeereistä muodostuneita yhdisteitä, mutta hunajassa voi olla myös joitakin sokerialkoholeja (polyoleja) (kuva 1). Hiilihydraattipitoisuus ja eri hiilihydraattien osuudet voivat vaihdella suuresti riippuen mehiläisten hunajan valmistamiseen käyttämästä kasvilajista, maantieteellisestä sijainnista sekä hunajan prosessointi- ja varastointiolosuhteista.

Tyypillisiä hunajasta löytyviä disakkarideja ovat mm. sakkaroosi, maltoosi, turanoosi, isomaltoosi, maltuloosi, trehaloosi, nigeroosi sekä kojibioosi, kun taas maltotrioosi ja melelitoosi ovat tavallisia hunajan trisakkarideja (Da Silva ym. 2016). Taulukossa 1 on

esitettyinä eri tutkimuslähteistä kerättyjä hunajassa esiintyvien di- ja trisakkaridien pitoisuuksia. Näistä pitoisuuksista voidaan hyvin nähdä eri hiilihydraattien pitoisuuksien vaihtelu eri hunajalähteissä. Taulukossa esitettyjen hiilihydraattien lisäksi hunajasta voidaan löytää vielä pienemmissä määrin useita muita di-, tri- ja oligosakkarideja.



Kuva 1. Hunajassa esiintyvien hiilihydraattien ja polyolien rakenteita: glukoosi (1), fruktoosi (2), ramnoosi (3), fukoosi (4), fusitoli (5), sakkaroosi (6), maltoosi (7), trehaloosi (8), isomaltoosi (9), turanoosi (10), kojibioosi (11), nigerioosi (12), β -gentiobioosi (13), raffinoosi (14), 1-kestoosi (15) ja meletsitoosi (16).

Taulukko 1. Eri tutkimuksissa hunajasta mitattuja di- ja trisakkaridien pitoisuuksia (g/100 g).

Hiilihydraatti	Useiden eri hunajien keskiarvo (De la Fuente ym. 2011)	Laventelihunaja (Cotte ym. 2004)	Sekakukkahunaja (Nozal ym. 2005)
Fruktoosi	37,1	38,5	36,3
Glukoosi	30,0	32,3	35,5
Sakkaroosi	0,49	4,7	0,24
Maltoosi	1,54	2,6	1,04
Kojibioosi	1,42	-	-
Turanoosi	2,16	1,8	2,20
Isomaltoosi	1,35	0,5	1,36
Maltuloosi	1,92	1,0	-
Nigeroosi	0,87	-	1,22
Trehaloosi	0,45	0,8	0,25
Trehaluloosi	1,14	-	-
Meletsitoosi	1,00	0,1	0,18
Erloosi	0,43	1,4	0,78
Panoosi	0,13	0,1	0,35

Hunajan varastointi ja käsittely saattavat aiheuttaa muutoksia sen hiilihydraattiprofilissa. Esimerkiksi hunajan varastointi +20 °C:n lämpötilassa puolen vuoden ajan pienensi sen sakkaroosipitoisuutta 79 %, kun taas fruktoosi- ja glukoosipitoisuudet suurenivat samaan aikaan noin 7 % ja 9 % (Rybak-Chmielewska 2007). Hunajan pitkäaikainen varastointi tai lämmitys voivat myös aiheuttaa pentoosien ja heksoosien muuntumista furfuraaliksi sekä 5-hydroksimetyylifurfulaariksi (5-HMF), jotka ovat tyypillisiä ei-entsymaattisen ruskistumisen, kuten Maillard-reaktion ja karamellisaation, tuotteita (Da Silva ym. 2016). Hunajan fruktoosi-glukoosisuhteen on havaittu vaikuttavan sen kiteytymiskäyttäytymiseen siten, että glukoosin suhteellisesti suurentunut pitoisuus lisää sen kiteytymisnopeutta (Escuredo ym. 2014).

2.1.2 Proteiinit ja aminohapot

Hunajan proteiinit ja aminohapot ovat peräisin sekä mehiläisistä että niiden pölyttämistä kasveista, minkä vuoksi eri hunajien proteiini- ja aminohappoprofiileissa voi olla merkittäviäkin eroja (Da Silva ym. 2016). Myös hunajan kokonaisproteiinipitoisuus voi vaihdella suuresti (0,1–3,3 %). Hunajan kuiva-aineista noin 0,1 % on vapaita aminohappoja, joista suurin osa (50–85 %) on proliinia (Belitz ym. 2004). Mehiläisten

muuttaessa keräämänsä meden hunajaksi niiden sylkirauhaseritteen mukana erittyy runsaasti proliinia, mikä selittää aminohapon suuren osuuden hunajassa. Proliinipitoisuuden avulla voidaan esimerkiksi pyrkiä arvioimaan hunajankypsyysastetta (Von der Ohe ym. 1991; Chua ja Adnan 2014). Muita hunajassa runsaammin esiintyviä aminohappoja ovat mm. glutamiinihappo, alaniini, fenyyialaniini, tyrosiini, leusiini sekä isoleusiini (Di Girolamo ym. 2012).

Varastointi ja lämpökäsittely voivat johtaa muutoksiin proteiinien ja aminohappojen rakenteissa tai pitoisuuksissa. Aminohapot esimerkiksi osallistuvat yhdessä pelkistävien sokereiden kanssa Maillard-reaktioon, mikä aiheuttaa mm. muutoksia näiden aminohappojen rakenteisiin sekä itse hunajan aistinvaraisiin ominaisuuksiin. Yhdeksän kuukauden pituisen varastoinnin havaittiin pienentävän hunajan kokonaisaminohappopitoisuutta, mutta toisaalta ensimmäisten varastointikuukausien aikana esimerkiksi proliinipitoisuuden havaittiin suurenevan (Iglesias ym. 2006).

2.1.3 Entsyymit ja orgaaniset hapot

Tyypillisiä hunajasta löytyviä entsyymejä ovat mm. invertaasi, diastaasi, glukoosioksideasi, katalaasi sekä hapan fosfataasi (Belitz ym. 2004). Glukoosioksideasi, invertaasi sekä diastaasi kulkeutuvat hunajaan mehiläisten omien eritteiden mukana, kun taas katalaasi ja hapan fosfataasi ovat peräisin kasveista kerätystä medestä ja siitepölystä. Entsyymien pääasiallinen tehtävä hunajassa on pitkäketjuisten hiilihydraattien hydrolysoiminen aina monosakkarideiksi asti, mutta entsyymeillä on myös joitakin muita hunajan ominaisuuksien kannalta merkittäviä vaikutuksia. Esimerkiksi glukoosioksidaasin hapettaessa glukoosia syntyy reaktion sivutuotteena vetyperoksidia, joka osaltaan estää bakteerien kasvua hunajassa. Hunajan invertaasi- ja diastaasiaktiivisuudet ovat tärkeitä tekijöitä arvioitaessa hunajan laatua ja alkuperää. Entsyymiaktiivisuudet voivat kuitenkin vaihdella merkittävästi riippuen kasvien meden erityksen runsaudesta. Tämä johtuu siitä, että mehiläiset lisäävät entsyymeitä keräämäänsä meteen, jolloin runsaan meden erityksen yhteydessä lisättyjen entsyymien pitoisuus jää hunajassa pienemmäksi (Persano Oddo ym. 1999). Esimerkiksi vadelman ja horsman meden tuotto voi olla normaalia runsaampaa, mikä näkyy näiden kasvien medestä valmistetuissa hunajissa luonnostaan pienempinä entsyymiaktiivisuuksina (Salonen 2011). Pelkän entsyymiaktiivisuuden perusteella ei siis voida tehdä suoraan johtopäätöksiä hunajan laadusta, vaan eri kasvilajien meden erityksen määrä on otettava myös huomioon laatua arvioitaessa.

Hunajan lievä happamuus johtuu sen sisältämisestä orgaanisista hapoista (Da Silva ym. 2016). Entsyymeillä on merkittävä vaikutus hunajan happopitoisuuteen, sillä entsyymaattisten reaktioiden seurauksena hiilihydraateista syntyy joko primääri- tai sekundäärituotteina orgaanisia happoja. Nämä hapot vaikuttavat useisiin hunajan ominaisuuksiin kuten väriin, makuun, happamuuteen ja sähkönjohtavuuteen. Glukoosioksidaasin aiheuttamasta glukoosin hapettumisesta johtuen glukonihappo on hunajan yleisin orgaaninen happo (Belitz ym. 2004). Hunajassa glukonihappo esiintyy tasapainossa glukonolaktonin kanssa. Hunajan happopitoisuus on vahvasti riippuvainen mehiläisten meden keräämisen ja hunajan kennossa kypsymisen välisestä ajasta. Glukoosioksidaasin aktiivisuus on enää hyvin vähäistä ja toisaalta glukonihapon määrä suuri kauan kypsyneessä ja vahvasti kiteytyneessä hunajassa. Muita orgaanisia happoja kuten etikka-, voi-, maito-, sitruuna-, meripihka-, muurahais-, omena- ja oksaalihappoa esiintyy hunajassa glukonihappoon verrattuna vain pieniä määriä. Myös näiden pienemmissä määrin esiintyvien happojen pitoisuuksien on havaittu kasvavan ajan kuluessa, mikä lisää hunajan happamuutta sen kypsyessä (Cavia ym. 2007). Hunajan kontaminoituminen saattaa edesauttaa sen hiilihydraattien fermentoitumista, mikä taas saattaa johtaa ei-toivottujen, tuotteiden aistittavaa laatua heikentävien happojen muodostumiseen (Da Silva ym. 2016).

2.1.5 Vitamiinit sekä kivennäis- ja hivenaineet

Hunajan on havaittu sisältävän sekä C-vitamiinia että etenkin B-ryhmän vitamiineja, jotka kulkeutuvat hunajaan kasvien siitepölyn mukana (Da Silva ym. 2016). Hunajasta on löydetty ainakin tiamiinia (B1), riboflaviinia (B2), niasiinia (B3), pantoteenihappoa (B5), pyridoksiinia (B6), biotiinia (B8) sekä folaattia (B9). Hunajan valmistuksessa tapahtuva suodatus voi vaikuttaa hunajan vitamiinipitoisuuteen, sillä suodatuksessa hunajasta poistuu suurin osa siinä olevasta siitepölystä. Myös C-vitamiinin suuri hapettumisherkkyys saattaa vaikuttaa hunajan vitamiinipitoisuuteen, sillä valo, lämpö, happi sekä hunajassa luonnostaan oleva vetyperoksidi ovat kaikki riskitekijöitä C-vitamiinin hapettumiselle.

Kukkaishunajan kivennäis- ja hivenainepitoisuus voi vaihdella vaaleiden hunajien 0,04 %:sta tummempien hunajien 0,5 %:iin ja joissakin mesikastehunajissa pitoisuus voi olla jopa 1–2 % (Escuredo ym. 2012; Alqarni ym. 2014). Kaikista hunajan kivennäis- ja hivenaineista kaliumin osuus on jopa kolmannes. Kaliumin lisäksi hunajassa on kohtalaisia määriä magnesiumia, rautaa ja kalsiumia sekä pienempiä määriä mm. fosforia, natriumia,

mangaania ja sinkkiä. Hunajassa olevat kivennäis- ja hivenaineet ovat pääosin peräisin mehiläisten pölyttämistä kasveista, joten eri hunajien kivennäisainepitoisuudet vaihtelevat merkittävästi sen mukaan, mistä kasveista mesi on kerätty ja minkälaisessa maaperässä kasvit ovat kasvaneet.

2.1.6 Muut yhdisteet

Hunajassa olevat fenoliset yhdisteet ovat pääosin erilaisia flavonoideja (Da Silva ym. 2016). Yleisimpiä yhdisteitä ovat mm. ferulahappo, p-kumaarihappo, kversetiini, kamferoli ja kahvihappo (Alvarez-Suarez ym. 2012). Näiden yhdisteiden mitattu pitoisuus oli 20–60 µg/ml. Flavonoidit ovat merkittävimpiä hunajasta löytyviä antioksidantteja, minkä vuoksi niiden avulla on pyritty perustelemaan hunajaan liitettyjä terveysvaikutuksia. Myös fenoliset yhdisteet ovat alttiita prosessoinnin myötä tapahtuville muutoksille. Esimerkiksi hunajan lämpökäsittelyn sekä hunajasta pienissä määrin löytyvän vetyperoksidin on havaittu olevan riskitekijöitä fenolisten yhdisteiden hapettumiselle.

Useat erilaiset haihtuvat yhdisteet vaikuttavat hunajalle ominaiseen aromiin. Yli 400 erilaista makuun vaikuttavaa haihtuvaa yhdistettä on löydetty tutkittaessa eri hunajalajeja (Da Silva ym. 2016). Suuri osa haihtuvista yhdisteistä tulee hunajaan meden mukana, minkä vuoksi lajihunajissa voi usein olla suhteellisen voimakas alkuperäkasville tyypillinen aromi. Mehiläiset pystyvät muokkaamaan meden mukana tulevia aromiaineita sekä myös itse tuottamaan niitä hunajaan, mikä lisää erilaisten hunajasta löytyvien aromien määrää. Lisäksi hunajan varastoinnilla ja jälkikäsittelyillä, kuten suodatuksella ja kuumentamisella, on omat vaikutuksensa hunajan aromeihin.

Joidenkin kasvien tuottama mesi saattaa aiheuttaa hunajaan myrkyllisten yhdisteiden syntymistä (Belitz ym. 2004). Tällaisia kasveja ovat mm. alppiruusut (*Rhododendron*), jotkin kanervakasvit (*Ericaceae*), kalmiapensaat (*Kalmia*) ja tyräkkikasvit (*Euphorbiaceae*). Myös heinäsiirakkojen erittämästä mesikasteesta valmistettu hunaja voi sisältää myrkyllisiä yhdisteitä. Esimerkiksi alppiruusuhunajan sisältämät myrkylliset yhdisteet andromedotoksiini ja grayanotoksiinit ovat lääketieteessä käytettäviä lihasrelaksantteja. Sen sijaan muuten myrkyllisistä kasveista, kuten tupakasta ja oleanterista, kerätystä medestä valmistettu hunaja ei ole myrkyllistä.

2.2 Laji- ja sekahunajat

Hunajat voidaan luokitella niiden botaanisen alkuperän perustella joko seka- tai lajihunajiin. Sekahunajassa mehiläiset keräävät hunajaan tarvittavan meden kahdesta tai useammasta eri kasvilajista. Lajihunajaksi saa kutsua hunajaa, joka on valmistettu pääosin vain yhden kasvilajin medestä tai se muuten täyttää kasvilähteen organoleptiset, fysikaalis-kemialliset ja mikroskooppiset ominaisuudet (EY 2002). Lajihunajille on tyypillistä, että niillä voi olla yksilöllisiä maku- ja hajuominaisuuksia sekä mahdollisesti lajispesifejä terveysvaikutuksia (Bogdanov ym. 2008; Salonen 2011). Esimerkiksi eri lajihunajien antibakteerisissa ominaisuuksissa on havaittu olevan eroja (Salonen ym. 2017). Tämän lisäksi lajihunajien myyntihinnat ovat tyypillisesti sekahunajia suurempia, mikä tekee niistä houkuttelevan kohteen hunajaväärentäjille. On kuitenkin otettava huomioon, että täysin puhdasta lajihunajaa ei käytännössä ole olemassa, sillä mehiläiset keräävät mettä lähes poikkeuksetta useista eri kasveista (Salonen 2011). Hunaja luokitellaan tavallisesti lajihunajaksi, kun vähintään 45 % hunajassa olevasta siitepölystä on peräisin yhdestä kasvilajista. Mesikastehunajassa niin sanottujen mesikastemerkkien (esim. erilaiset sienitiöt, -rihmastot ja levät) suhde siitepölyhiukkasten määrään tulisi olla yli 3, jotta hunajaa voidaan kutsua mesikastehunajaksi (Von Der Ohe ym. 2004).

Lajihunajien tunnistamisessa ongelmaksi muodostuu se, että on hyvin vaikea määrittää, kuinka suuri osa medestä on kerätty mistäkin kasvista. Esimerkiksi hunajan aistinvaraisten ominaisuuksien avulla voidaan pyrkiä tunnistamaan lajihunajien pääasialliset kasvilähteet ja eri kasveista kerätyn meden osuudet hunajassa (Persano Oddo ja Bogdanov 2004). Myös siitepölyanalyysia (melissopalynologia) on perinteisesti käytetty lajihunajien karakterisoimiseen, ja se onkin yksi vanhimmista lajihunajien tunnistamiseen käytetyistä menetelmistä (Salonen 2011; Zábrodská ja Vorlová 2015). Menetelmässä analysoidaan hunajaan pölytyksen mukana kulkeutuneiden siitepölyhiukkasten määrää sekä alkuperää mikroskopioimalla. Menetelmä on kuitenkin hyvin työläs ja vaatii suorittajalta paljon kokemusta ja ammattitaitoa, jotta eri kasvien siitepölyhiukkaset pystytään erottamaan toisistaan. Esimerkiksi virolaisessa hunajassa on havaittu olevan siitepölyä keskimäärin 13:sta eri kasvilajista (Puusepp ja Koff 2014). Lisäksi eri kasvilajien kukista irtoavan siitepölyn määrä sekä mehiläisten käyttäytyminen pölytyslennoilla voivat vaihdella paljonkin, minkä vuoksi siitepölyn määrä medessä ei aina täysin korreloi kasvista kerätyn meden määrän kanssa.

Siitepölyn mikroskooppisen tutkimuksen rinnalle on kehitetty viime vuosina muutamia DNA:n määrittelyyn perustuvia menetelmiä, joissa siitepölyhiukkasten tunnistaminen tapahtuu niiden sisältämän DNA:n avulla (Zábrowská ja Vorlová 2015). Myös nämä menetelmät ovat kuitenkin työläitä ja aikaa vieviä toteuttaa, mikä hankaloittaa niiden käyttöä rutiinitutkimuksessa.

Riittävän suuren siitepölymäärän lisäksi hunajan tulee täyttää sille asetetut fysikaalis-kemialliset (esim. väri, sähkönjohtavuus, pH, proliinipitoisuus, kosteus sekä diastaasi- ja invertaasiaktiivisuus) ja organoleptiset (maku, tuoksu ja aromi) vaatimukset, mikäli hunaja halutaan luokitella lajihunajaksi. Hunajan organoleptisiä ominaisuuksia pidetään jopa meden tai siitepölyn määrää parempana mittarina tunnistettaessa erilaisia lajihunajia (Persano Oddo ja Bogdanov 2004). Hunajan aistinvarainen arviointi vaatii kuitenkin paljon ammattitaitoa, sillä joidenkin kasvien medellä voi pieninäkin määrinä olla suuri vaikutus hunajan aromiin, kun taas joidenkin kasvien meden vaikutus aromiin on suurinakin määrinä melko vähäinen. Erilaisia lajihunajan lähteeksi sopivia kasveja on pelkästään Euroopassa yli sata eri lajia, mikä tekee lajihunajien kirjosta hyvin laajan (Persano Oddo ym. 2004).

Suurin osa Suomessa tuotetusta kaupallisesta hunajasta on sekahunajaa (Salonen 2011), kun taas esimerkiksi Italiassa, Espanjassa ja Ranskassa myydystä hunajasta jopa puolet on erilaisia lajihunajia (Persano Oddo ja Bogdanov 2004). Merkittävä syy sekahunajan yleisyyteen Suomessa on se, että kasvien kasvukausi on Suomen kesästä johtuen hyvin lyhyt ja suurin osa kasveista kukkii samanaikaisesti, jolloin tuotantomäärien maksimoimiseksi hunajaa kerätään mahdollisimman monista eri kasvilähteistä. Lyhyen kasvukauden vuoksi hunajasatoa päästään keräämään pääosin vain kerran vuodessa, mikä myös luo painetta mahdollisimman suurille tuotantomäärille. Lounais-Suomessa pääasiallisena hunajan lähteenä toimivat *Brassica*-suvun kasvit, kun taas muualla Suomessa hunajan lähteenä toimivat paikalliset villinä kasvavat kasvilajit (Salonen 2011). Muutamat kasvilajit kuten paju (*Salix* spp.), voikukka (*Taraxacum* spp.), puolukka (*Vaccinium vitis-idaea* L.), vadelma (*Rubus idaeus* L.), maitohorsma (*Epilobium angustifolium* L.), kanerva (*Calluna vulgaris* L.) sekä apilat (*Trifolium* spp.) tarjoavat potentiaalisesti riittävän suuria satoja lajihunajien tuottamiseen. Lisäksi kuivat ja lämpimät kesät voivat myös tarjota mahdollisuuden mesikastehunajan laajamittaiseen tuotantoon.

2.3 Hunajan alkuperä ja aitous

Hunajan kasvanut kysyntä sekä siitä johtuva hunajan hinnan nousu on lisännyt elintarvikeväärentäjien mielenkiintoa hunajaa kohtaan (Da Silva ym. 2016). Lisäksi ympäristön kasvavat saastekuormat sekä mehiläispopulaatioiden lisääntyneet sairaudet ovat vähentäneet mehiläisten määrää maailmassa, mikä yhdessä kasvavan kysynnän kanssa on tehnyt hunajasta koko ajan halutummaksi, mutta samalla vaikeammin saatavilla olevan hyödykkeen (Potts ym. 2016). Esimerkiksi Tšekissä markkinoilta löytyvästä hunajasta noin puolet on arvioitu olevan jollain tavalla poikkeavaa tai väärennettyä (Záborská ja Vorlová 2015). Hunajaväärennökset voidaan karkeasti jakaa suoriin ja epäsuoriin väärennöksiin. Suorissa väärennöksissä hunajaan lisätään suoraan ylimääräisiä komponentteja kuten esimerkiksi sokerisiirappia laimentamaan hunajaa tai väriaineita muuttamaan hunajan ulkonäköä houkuttelevammaksi. Siirappilisäyksen havaitseminen voi olla hankalaa, sillä väärennetyn hunajan hiilihydraattiprofiili voidaan keinotekoisesti muokata muistattamaan aidon hunajan profiilia. Epäsuorassa väärentämisessä sen sijaan mehiläisille syötetään ylimäärin lisäravintoa, mikä aiheuttaa muutoksia hunajan koostumukseen. Lisäksi hunajaväärennöksiksi voidaan laskea tapaukset, joissa myytävän tuotteen tuotekuvaus ei vastaa tuotteen ominaisuuksia. Esimerkiksi Saksassa ja Itävallassa mesikastehunajia arvostetaan enemmän kuin kukkaishunajia, jolloin myymällä kukkaishunajaa mesikastehunajana pystytään vähemmän haluttua tuotetta myymään suuremmalla hinnalla (Wang ja Li 2011).

2.3.1 EU-tutkimus hunajaväärennöksistä

Vuonna 2015 Euroopan Komissio käynnisti projektin, jonka tarkoituksena oli tutkia EU:n alueelta mahdollisesti löytyviä hunajaväärennöksiä (Aries ym. 2016). Projektin taustalla oli, että Komission tietoon oli toistuvasti tullut ilmoituksia hunajista, jotka eivät täytäneet EU-lainsäädännön kriteereitä (EY 2002). Tutkimuksen kohteena oli kaksi pääkohtaa: väärät merkinnät hunajan maantieteellisestä tai botaanisesta alkuperästä sekä hunajaan lisätyt ylimääräiset sokerit tai sokerivalmisteet. Hunajanäytteitä kerättiin kaikista EU-jäsenvaltioista sekä Norjasta ja Sveitsistä yhteensä yli 2000 kappaletta. Kerätyt näytteet jaoteltiin kolmeen eri ryhmään: A) yhdestä jäsenmaasta kerätyt ja sieltä peräisin olevat hunajat, B) yhdestä jäsenmaasta kerätyt, mutta toisesta maasta (EU tai EU:n ulkopuolinen) peräisin olevat hunajat sekä C) hunajaseokset, jotka sisälsivät vähintään kahdessa eri

maassa tuotettua hunajaa. Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa kaikille A- ja B-ryhmän näytteille suoritettiin aistinvarainen arviointi, mitattiin sähkönjohtavuus ja diastaasiaktiivisuus sekä selvitettiin niiden siitepölyprofiilit. Toisessa vaiheessa kolmasosa ensimmäisen vaiheen myötä hyväksytyistä näytteistä sekä kaikki C-ryhmän näytteet analysoitiin niiden hiilihydraattiprofiilin selvittämiseksi. Kolmanteen vaiheeseen valikoituivat ne näytteet, joiden hiilihydraattiprofiileissa ei havaittu ongelmia. Näille näytteille suoritettiin vielä hiili-isotooppianalyysi käyttäen alkuaineanalyysiin yhdistettyä isotooppisuhdemassaspektrometristä menetelmää (EA-IRMS), johon oli yhdistetty neste-kromatografinen isotooppisuhdemassaspektrometrinen määrittämenetelmä (LC-IRMS).

Tehtyjen määrittysten tuloksena 9-20 %:ssa eri lähteistä kerätyissä hunajissa havaittiin olevan mahdollisia väärennökseen viittaavia merkkejä (Aries ym. 2016). Eniten epäiltyjä väärennöksiä havaittiin EU:sta peräisin olevissa hunajien seoksissa sekä EU-maista että ei-EU-maista peräisin olevissa ei-sekoitetuissa hunajissa. Lisäksi yleisesti lajihunajissa havaittiin olevan hieman suurempi määrä epäilyttäviä näytteitä (16,8 %) kuin sekahunajissa (12,8 %). Mesikastehunajaksi merkityistä näytteistä jopa 36 % herätti epäilyksen mahdollisesta väärennöksestä, kun kukkaishunajanäytteissä vastaava osuus oli noin 12 %. Vaikka tutkimuksen päätelmissäkin todetaan, että väärennosten havaitsemiseen ja hunajan alkuperän määrittämiseen käytetyt analyysimenetelmät vaativat vielä monelta osin kehittämistä ja optimointia, voidaan sanoa, että mahdolliset hunajaväärennökset niin EU:ssa kuin sen ulkopuolella tuotetuissa hunajissa ovat jo nykytiedon perusteella vakava uhka.

2.3.2 Hiilihydraattien lisääminen hunajaan

Hiilihydraattien avulla tehtävät hunajaväärennökset voidaan jakaa kahteen pääryhmään hiilihydraattien lähteenä olevien kasvien perusteella. Jaottelu perustuu kasvien erilaiseen hiilimetaboliaan, minkä vuoksi niitä kutsutaan C3- ja C4-kasveiksi (Záborská ja Vorlová 2015). C3-kasvit muokkaavat ilmakehän hiilidioksidin hiilihydraateiksi Calvinin kierron avulla, kun taas C4-kasvit käyttävät muokkaukseen Hatch-Slack-prosessia. Tämä ero hiilimetaboliassa näkyy myös eroina näistä kasveista saatavien hiilihydraattien ominaisuuksissa. C3-kasvien hiilihydraateissa esimerkiksi ^{13}C - ja ^{12}C -hiili-isotooppien välinen suhde on pienempi kuin C4-kasvien tuottamissa hiilihydraateissa.

Maissista ja ruokosokerista valmistetut tuotteet ovat tavallisimmat C4-kasvien hiilihydraatteja sisältävät hunajan väärentämiseen käytettävät aineet (Záborská ja Vorlová

2015). Näiden hiilihydraattien lisäyksen havaitsemiseen käytetään mm. ^{13}C - ja ^{12}C -hiili-isotooppien välisen suhteen määrittämistä sekä hunajassa että hunajasta eristetyissä proteiineissa. Mehiläiset suosivat medenkeruussa tavallisesti C3-kasveja, minkä vuoksi C4-kasvien hiilihydraatteja ei yleensä juurikaan löydy hunajasta. Souza-Kruliskin ym. (2010) kehittämällä isotooppimenetelmällä pystyttiin havaitsemaan 7 %:n C4-kasvipohjaisten hiilihydraattien lisäys hunajassa. Cotte ym. (2007) käyttivät massaspektrometriaan yhdistettyä isotooppianalyysiä ja onnistuivat menetelmän avulla havaitsemaan pienimmillään n. 10 %:n siirappilisäyksen hunajassa. Isotooppisuhteen määrittämiseen perustuvat menetelmät ovat kuitenkin yleensä kalliita ja haastavia suorittaa eivätkä tämän vuoksi sovellu kovin hyvin rutiinivalvontaan.

Glukoosi-fruktoosisiirappia käytetään myös yleisesti hunajaväärennöksissä johtuen sen halvasta hinnasta sekä hunajaa muistuttavasta koostumuksesta (Zábrodská ja Vorlová 2015). Siirappia käytetään suoran hunajaan lisäämisen lisäksi myös mehiläisten ruokintaan etenkin talvella ja alkukeväästä, kun mettä ei vielä ole saatavilla ravinnoksi. Glukoosi-fruktoosisiirapin lisäyksen havaitsemiseksi on kehitetty mm. massaspektrometriaan (MS) (Agila ja Barringer 2013), Raman-spektroskopiaan (Li ym. 2012) ja kaasukromatografiaan (GC) (Ruiz-Matute ym. 2007) perustuvia menetelmiä. Myös HPAEC-PAD-tekniikkaan perustuvia menetelmiä on kehitetty siirappien lisäyksen havaitsemiseksi hunajasta. Morales ym. (2008) tutkivat maissi- ja glukoosi-fruktoosisiirapeilla tehtyjä hunajaväärennöksiä käyttäen hyväksi siirapeissa esiintyvien malto-oligosakkaridien määrittämistä. Menetelmän avulla pystyttiin havaitsemaan alimmillaan 5 %:n siirappilisäykset hunajanäytteessä. Menetelmän etuina aiemmin käytettyihin menetelmiin verrattuna olivat sen nopeus sekä pienemmät kustannukset. Myös Megherbi ym. (2009) käyttivät hyväksi HPAEC-PAD-tekniikkaa tutkiessaan maissisiirapilla tehtäviä hunajaväärennöksiä. Myös tämä menetelmä perustui siirapin mukana tulleiden oligosakkaridien määrittämiseen hunajasta. Menetelmän avulla pystyttiin havaitsemaan jopa vain 1 %:n siirappilisäys hunajassa.

Koska mehiläiset suosivat luonnostaan C3-yhteyttäviä kasveja meden keruussa, on C3-kasvien hiilihydraatteihin pohjautuvien väärennösten havaitseminen huomattavasti hankalampaa (Zábrodská ja Vorlová 2015). Esimerkiksi ^{13}C - ja ^{12}C -isotooppien välistä suhdetta ei voida käyttää väärennösten havaitsemiseen. Tämän vuoksi etenkin riisi-, vehnä- ja sokerijuurikas pohjaiset väärennökset ovat erittäin hankalia havaita verrattuna maissi- ja sokeriruokopohjaisiin väärennöksiin. C3-hiilihydraatteja sisältävien väärennösten havaitsemiseksi on perinteisesti käytetty monimutkaista EA/LC-IRMS-menetelmää, jossa

isotooppisuhdemassaspektrometrian, alkuaineanalyysin ja nestekromatografian yhdistelmällä voidaan havaita C3-hiilihydraattien lisäys hunajassa.

Riisisiirapilla tapahtuvien väärennosten havaitsemiseen voidaan myös yrittää käyttää nestekromatografian ja tandem-massaspektrometrian yhdistävää LC-MS/MS-menetelmää, jossa hunajasta pyritään etsimään 2-asetyyli-3-glukopyranosidia, joka on hunajaan riisisiirapin mukana kulkeutuva spesifinen merkkiaine (Zábrowská ja Vorlová 2015). Lisäksi ulkoisten gamma-amylaasien määrittämisellä käyttäen LC-IRMS-menetelmää voidaan pyrkiä havaitsemaan riisisiirapin lisäys hunajassa (Fei ym. 2012). Nämä menetelmät soveltuvat myös maissista ja vehnästä valmistetun inverttisokerin havaitsemiseen. Myös sokerijuurikas- ja vehnäpohjaisten väärennosten havaitsemiseksi voidaan hunajasta yrittää etsiä sinne kuulumattomia oligosakkarideja käyttäen nestekromatografiaan yhdistettyä valonsirontadetektoria (LC-ELSD) tai vieraita entsyymejä esimerkiksi taitekerroindetektioon yhdistetyn nestekromatografian (HPLC-RI) avulla (Zábrowská ja Vorlová 2015). Esimerkiksi β -fruktofuranosidaasi on hunajassa vieras entsyymi, jonka avulla voidaan pyrkiä havaitsemaan sokerijuurikaspohjaisia hunajaväärennöksiä.

Muista nestekromatografiaan perustuvista menetelmistä esimerkiksi Cotten ym. (2003) kehittämän menetelmän avulla pystyttiin hunajien lajikiraktersoimisen lisäksi myös havaitsemaan 5-10 %:n pitoisuudella tapahtuva sekä C3- että C4-kasvipohjaisten siirappien lisäys hunajassa. Siirappiväärennosten havaitsemiseksi käytettiin hyväksi PCA-analyysiä, jonka avulla pystyttiin erottamaan puhtaat hunajanäytteet siirapilla väärennetyistä näytteistä. Merkittävää oli, että tutkimuksessa mukana olleista kaupallisista näytteistä löydettiin useita poikkeavuuksia ja joissakin tapauksissa pystyttiin jopa tunnistamaan epäiltyyn väärentämiseen käytetyn siirapin alkuperä. Wangin ym. (2015) kehittämällä HPLC-menetelmällä pystyttiin havaitsemaan vielä pienempi, vain 2,5 %:n tärkkelyspohjaisen siirapin lisäys hunajanäytteissä. Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan sekä C3- että C4-kasvipohjaisten siirappien lisäys, mikä tekee menetelmästä varteenotettavan vaihtoehdon siirapilla tapahtuvien hunajaväärennosten tunnistamiseen.

2.3.3 Epäsuorat hunajaväärennökset

Mehiläiset tarvitsevat etenkin talvella lisäravintoa täyttämään niiden ravinnontarpeen sekä pitämään yllä normaalia lisääntymiskäyttäytymistä (Aries ym. 2016). Myös kasvien meden erityksessä voi olla suurta vaihtelua eri tuotantoalueiden välillä ja huonot kasvukauden

sääolot voivat vähentää meden eritystä, mikä myös aiheuttaa lisäravinnon tarvetta. Tavallisimpia mehiläisten lisäravinnon lähteitä ovat erivahvuiset sakkaroosi-vesiliuokset sekä erilaiset sokerisiirapit. Mehiläisten ruokinta sakkaroosilla on Suomessakin tavallinen ja täysin sallittu toimenpide talvella tai muina niukkaravintoisina aikoina. Kuitenkin mehiläisten liiallinen ruokkiminen lisäravinnolla pääasiallisen kasvukauden aikana, kun ravintoa on muutenkin tarpeeksi saatavilla, on yksi tapa tehdä hunajaväärennöksiä. Tämä on myös yksi vaikeimmin havaittavissa olevista tavoista väärentää hunajaa, sillä mehiläisille syötetty lisäravinto käy läpi hunajan valmistuksen entsymaattiset prosessit, jolloin väärennetty hunaja voi analysoitaessa muistuttaa hyvin paljon aitoa hunajaa.

Vaikka hunajan epäsuoraa väärentämistä on huomattavasti vaikeampi havaita, on myös tämän ongelman ratkaisemiseksi kehitetty analyysimenetelmiä. Cordella ym. (2005) käyttivät HPAEC-PAD-menetelmää yhdessä tilastollisen monimuuttuja-analyysin kanssa tutkiessaan sokerisiirapilla tapahtuvaa mehiläisten ruokintaa. Tutkimuksessa havaittiin, että liiallinen ruokinta aiheuttaa muutoksia hunajan koostumukseen, kuten pienten hiilihydraattien, proteiinien, aminohappojen ja orgaanisten happojen vähenemistä. Vaikutukset olivat vastaavia kuin siirappien suorassa lisäyksessä hunajaan. Tämän vuoksi hunajan keruuta liian pian myös sallitun lisäravinnolla ruokkimisen jälkeen tulisi välttää, jotta hunajan koostumus ei muuttuisi liikaa. Myös Cotte ym. (2004) havaitsivat, että mehiläisten ruokkiminen sokerisiirapilla aiheutti muutoksia hunajan hiilihydraattiprofiilissa.

Hiili-isotooppien välistä suhdetta on myös tutkittu epäsuorien hunajaväärennösten havaitsemiseksi (Guler ym. 2014). Menetelmän avulla hunajassa pystyttiin havaitsemaan alimmillaan 20 litran glukoosi-fruktoosisiirapin käyttö lisäravintona mehiläispesää kohti. Menetelmä ei soveltunut kuitenkaan C3-pohjaisten hiilihydraattien havaitsemiseen vaan ainoastaan C4-pohjaiset siirapit pystyttiin tunnistamaan. Bertellin ym. (2010) kehittämällä 1D- ja 2D-NMR-menetelmillä, jotka yhdistettiin tilastollisiin monimuuttuja-analyyseihin, pystyttiin hyvin tuloksin havaitsemaan seitsemällä erilaisella sokerisiirapilla tapahtunut mehiläisten ruokinta. Kahdesta kehitetystä menetelmästä parempia tuloksia saatiin yllättäen yksinkertaisemmalla ja nopeammalla 1D-menetelmällä, minkä vuoksi tutkijat suosittelivat sen käyttöä vastaavissa jatkotutkimuksissa.

2.3.4 Värimuutokset ja lämmityksen vaikutukset

Kuluttajia miellyttävä hunajan väri vaihtelee eri puolilla maailmaa (Bradbear 2009). Esimerkiksi Iranissa kuluttajien havaittiin arvostavan väriltään tummaa hunajaa (Ghorbani ja Khajehroshanaee 2009), kun taas Uruguayssa värimieltymykset vaihtelivat keski-tummasta tummaan (Gámbaro ym. 2007). Muuttamalla hunajan väriä kuluttajia miellyttävään suuntaan voidaankin muuten samaa hunajaa myydä suuremmalla hinnalla. Tyypillisesti hunajan väriä muutetaan tummemmaksi lisäämällä siihen ammoniumsulfiittimenetelmän sokerikulööriä (e150d) (Zábrodská ja Vorlová 2015). Perinteisesti hunajan väriä on mitattu Pfund-kryptometrillä tai spektrofotometrillä (Negueruela ja Perez-Arquillue 2000). Näiden lisäksi on viime aikoina kehitetty mm. LC-MS/MS-menetelmä värin lisäyksen tarkempaan havaitsemiseen (Zábrodská ja Vorlová 2015). Eri lajihunajia on myös pyritty luokittelemaan niille tyypillisen värin perusteella, mitä voidaan hyödyntää mm. hunajan botaanisen alkuperän tunnistamisessa (Tuberoso ym. 2014).

Hunajan lämmittämisen syynä voi olla esimerkiksi pitkiä aikoja varastoidun ja kiteytyneen hunajan saattaminen takaisin juoksevampaan ja kuluttajia miellyttävämpään muotoon. Hunajan lämmittäminen pitkiä aikoja yli 50 °C:n lämpötiloissa heikentää kuitenkin voimakkaasti hunajan laatua mm. tuhoamalla hunajan vitamiineja ja inaktivoimalla luontaisia entsyymejä (Zábrodská ja Vorlová 2015). Etenkin pienentyneiden invertaasi- ja diastaasiaktiivisuuksien perusteella voidaan tutkia hunajan mahdollista lämpökäsittelyä. Lisäksi kuumentamisen seurauksena hunajaan voi syntyä suuria HMF-pitoisuuksia. HMF aiheuttaa hunajassa muutoksia mm. sen värissä ja muissa aistinvaraisissa ominaisuuksissa, minkä lisäksi sillä on havaittu olevan mahdollisia sytotoksisia, genotoksisia ja karsinogeenisia vaikutuksia. Suuria HMF-pitoisuuksia voidaan myös käyttää indikaattorina mahdollisille inverttisokerin avulla tehdyille hunajaväärennöksille (Kalábová ym. 2003). Muita lämpökäsittelyn indikaattoreita hunajassa ovat mm. furfuryylialkoholit, 2-asetyyliifuraani sekä maltoli ja isomaltoli, jotka vaikuttavat hunajan väriin, makuun ja aromiin (Da Silva ym. 2016).

2.3.5 Hunajan botaaninen alkuperä ja hiilihydraattiprofiilin hyödyntäminen

Hunajan botaanista tai maantieteellistä alkuperää voidaan pyrkiä selvittämään monien erilaisten tekijöiden avulla. Hunajan alkuperää voidaan yrittää selvittää mm. analysoimalla siinä olevia flavonoideja, siitepölyä tai aromaattisia yhdisteitä (Zábrodská ja Vorlová

2015). Merkittävin proteiinin lähde hunajassa on kasveista meden mukana tullut siitepöly, minkä vuoksi hunajan proteiinien avulla voidaan pyrkiä määrittämään hunajan botaanista alkuperää (Da Silva ym. 2016). Myös hunajan kivennäis- ja hivenainepitoisuuksia on käytetty hyväksi botaanisen alkuperän selvittämisessä (Nozal Nalda ym. 2005). Hunajassa olevista orgaanisista hapoista johtuen eri lajihunajien pH voi vaihdella 3,5–5,5 (Bogdanov ym. 2004). Lajihunajalle tyypillistä pH:ta voidaan siis yrittää käyttää sen karakterisoimiseen, mutta tämä on kuitenkin suhteellisen karkea luokittelutapa, eikä sitä voida yksinään käyttää eri lajihunajien erottamiseen toisistaan. Myös hunajan hiilihydraattien avulla voidaan pyrkiä tunnistamaan eri lajihunajia. Esimerkiksi fruktoosin ja glukoosin pitoisuudet sekä niiden väliset suhteet vaihtelevat eri hunajalajien välillä, mitä on yritetty luoda tunnistuskeinoksi eri lajihunajien erottamiseksi toisistaan (Kaškonienė ym. 2010). Tyypillisesti fruktoosin pitoisuus on glukoosia suurempi eri hunajissa, mutta esimerkiksi rypsi- (*Brassica napus*) ja päivänkakkarahunajassa (*Taraxacum officinale*) glukoosi on pitoisuudeltaan suurin hiilihydraatti (Escuredo ym. 2014). Fruktoosi-glukoosisuhteen lisäksi hunajan tarkempaa hiilihydraattiprofiilia voidaan yrittää käyttää botaanisen alkuperän tunnistamiseen (De la Fuente ym. 2011).

Ajatus hunajan hiilihydraattiprofiilin määrittämisestä käyttäen HPAEC-PAD-menetelmää ja tämän avulla tapahtuvasta alkuperän määrittämisestä on lähes 30 vuotta vanha. Swallow ja Low (1990) havaitsivat, että vaikka eri lajihunajissa esiintyvät oligosakkaridit olivat pääosin samoja, oli niiden suhteellisissa pitoisuuksissa eri hunajissa suuriakin eroja. HPAEC-PAD-menetelmän hyvä herkkyys hiilihydraateille mahdollisti pienissäkin määrissä esiintyvien hiilihydraattien määrittämisen hunajasta, jolloin näiden hiilihydraattien vaihtelevien pitoisuuksien avulla havaittiin olevan mahdollista luoda kullekin lajihunajalle tyypillinen ”sormenjälki”. Goodall ym. (1995) kehittivät menetelmää edelleen ja lisäsivät mukaan tilastollisen monimuuttujamallin lajihunajien karakterisoimiseksi. Menetelmän avulla pystyttiin tunnistamaan lajihunajia huomattavasti perinteisesti tunnistamiseen käytettyä siitepölyanalyysiä nopeammin. Hiilihydraattien avulla tapahtuva hunajan tunnistaminen ei myöskään ollut herkkä hunajan suodattamisen yhteydessä tapahtuvalle siitepölyn poissuodattumiselle. Vaikka menetelmän avulla pystyttiin esimerkiksi erottamaan kanervahunaja täysin muista tutkimuksessa mukana olleista lajihunajista, oli menetelmässä kuitenkin myös omat rajoitteensa. Luotettavan lajihunajien tunnistamisen aikaan saamiseksi huomautettiin vaadittavan mm. riittävän suuri määrä näytteitä eri lajihunajista, jotta satunnaishajonnan vaikutus tilastollisessa mallinnuksessa saadaan minimoitua. Tämän jälkeen esimerkiksi Mora ja Marioli (2001)

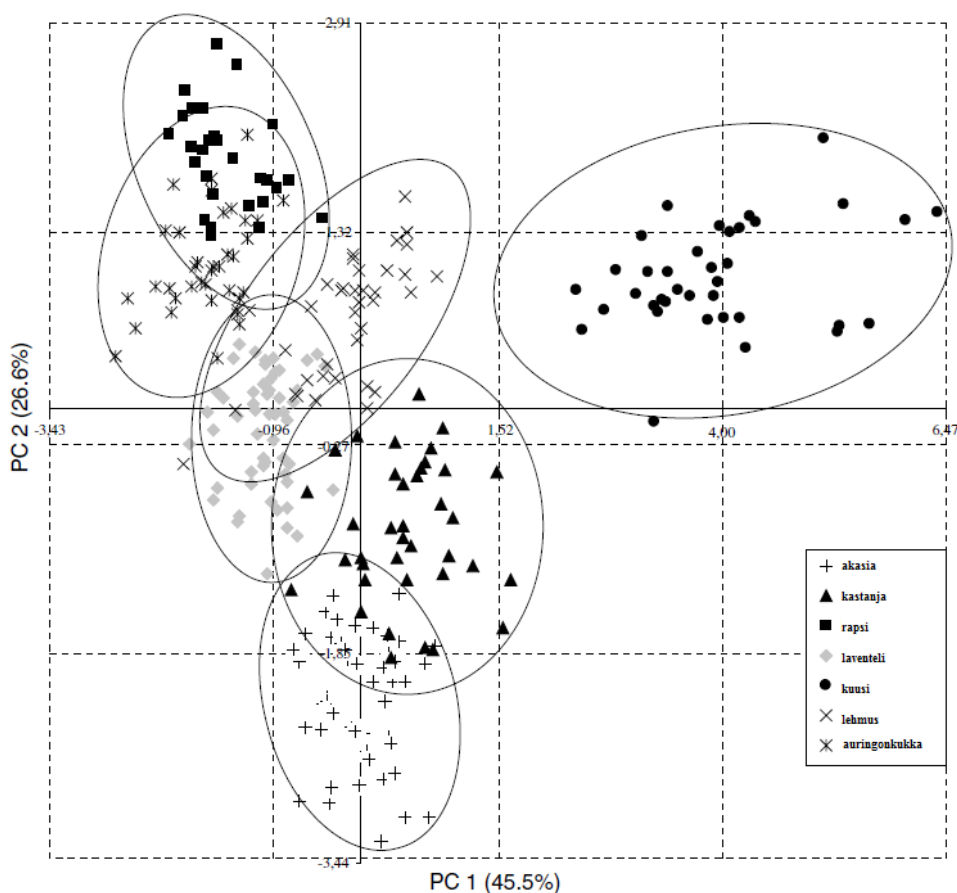
havaittivat kehittämällään HPAEC-PAD-menetelmällä olevan merkittävän potentiaalin hunajan hiilihydraattiprofiilin määrittämisessä

Eri lajihunajien hiilihydraattiprofiileja on tämän jälkeen yritetty määrittää useissa tutkimuksissa. Weston ja Brocklebank (1999) tutkivat uusiseelantilaisten hunajien hiilihydraattiprofiileja HPAEC-PAD-menetelmällä. Paikallisen erikoishunajan, manukahunajan, hiilihydraattiprofiilin merkittävimmät tekijät olivat glukoosin ja fruktoosin lisäksi isomaltoosi, kojibioosi, turanoosi/gentiobioosi, nigeroosi ja maltoosi sekä pienemmissä määrin sakkaroosi, erloosi ja panoosi. Etenkin maltoosin osuus oli suuri tutkituista oligosakkarideista. Apilahunajan hiilihydraattiprofiilin havaittiin muistuttavan hyvin paljon manukahunajan profiilia, kun taas kanervahunaja erosi näistä kahdesta hunajasta suuremman isomaltoosipitoisuuden sekä erloosin puuttumisen perusteella. Mesikastehunajan havaittiin sisältävän muita hunajia suuremman määrän eri komponentteja, joista erityisesti meletsitoosin suurta määrää voidaan pitää mesikastehunajalle tyypillisenä sormenjälkenä.

Cotte ym. (2003) tutkivat lajihunajien hiilihydraattiprofiileja käyttäen sekä HPAEC-PAD-että GC-menetelmää. Näytteinä käytettiin 141 ranskalaisten mehiläistarhaajien tuottamaa lajihunajaa, jotka oli siitepölyanalyysin perusteella tunnistettu joko akasia-, laventeli- tai kastanjahunajiksi. Näiden lisäksi tutkittiin yhteensä 35 kaupallista eri maista peräisin olevaa laventeli-, akasia- ja kastanjahunajaa. Menetelmän avulla hunajanäytteistä löydettiin 19 eri hiilihydraattia, joista suurimmat pitoisuudet olivat glukoosilla, fruktoosilla, maltoosilla, isomaltoosilla, turanoosilla, trehaloosilla, laminaribioosilla ja erloosilla. Etenkin laventelihunajassa sakkaroosipitoisuus oli selvästi kahta muuta lajihunajaa suurempi. Laventelihunajien sisäinen sakkaroosivaihtelu oli kuitenkin myös suurta ja tutkitut näytteet voitiin jakaa kahteen eri populaatioon (pitoisuus lähes 10 % sekä pitoisuus 1-3 %). Syynä tähän nähtiin ero mehiläisten tuottamissa entsyymeissä, jotka pilkkoivat disakkarideja monosakkarideiksi. Kastanjahunaja poikkesi kahdesta muusta tutkitusta lajihunajasta johtuen sen pienemmistä trisakkaridipitoisuuksista. Etenkin erloosipitoisuus oli hyvin pieni kastanjahunajassa.

Cotte ym. (2004) tutkivat myös hunajan hiilihydraattiprofiilin perusteella tapahtuvaa botaanisen alkuperän määrittämistä. Tutkimuksen kohteena oli 280 ranskalaista lajihunajaa (akasia-, kastanja-, laventeli-, rapsi-, kuusi-, lehmus- ja auringonkukkahunajia), jotka oli ennakkoon tunnistettu siitepölyanalyysin avulla. Näiden lisäksi tutkimuksessa oli mukana 47 kaupallista lajihunajaa, joita ei ollut tunnistettu ennakkoon siitepölyanalyysillä. Näytteiden hiilihydraattipitoisuudet analysoitiin käyttäen HPAEC-PAD-menetelmää ja

saatujen tulosten perusteella näytteet pyrittiin luokittelemaan PCA:n avulla. Tutkimuksessa ei pystytty täydellisesti erottamaan eri lajihunajia toisistaan, mutta PCA:n avulla löydettiin eri lajihunajille tyypillisiä taipumuksia (kuva 2). Ainoastaan kuusihunajan havaittiin eroavan muista lajihunajista, minkä nähtiin johtuvan sen suurista trehaloosi- ja raffinoosipitoisuuksista. Lisäksi fruktoosi-glukoosisuhteen havaittiin olevan merkittävä eroa tuova tekijä eri lajihunajien välillä. Esimerkiksi akasia- ja auringonkukkahunajat pystyttiin erottamaan menetelmän avulla toisistaan, mutta toisaalta osa lajihunajista, kuten laventeli- ja lehmushunajat, eivät juurikaan eronneet toisistaan. Menetelmän avulla ei myöskään pystytty luotettavasti tunnistamaan tuntemattomien kaupallisten hunajanäytteiden botaanista alkuperää. Tutkimuksessa osa tuntemattomista kaupallisista näytteistä herätti epäilyjä mahdollisesta väärennöksestä, mutta menetelmän tarkkuus ei vielä riittänyt täydellisesti varmistamaan näitä epäilyjä. Kuitenkin yhdistettynä muihin määrittämismenetelmiin hunajan hiilihydraattiprofiilia pidettiin varteenotettavana tekijänä määritettäessä hunajan botaanista alkuperää.



Kuva 2. Cotten ym. (2004) PCA-malli, jossa 7:ää eri botaanista alkuperää ollutta 280 hunajanäytettä on lajiteltu niistä mitattujen seitsemän eri parametrin perusteella (glukoosi-, fruktoosi-, raffinoosi- ja trehaloosipitoisuus sekä fruktoosi-glukoosi-, maltoosi-trehaloosi- ja erloosi-maltuloosisuhde).

Nozal ym. (2005) tutkivat espanjalaisten lajihunajien botaanista alkuperää käyttäen hyväksi HPAEC-PAD-menetelmän avulla määritettyjä hiilihydraattiprofiileja sekä tulosten analysointia tilastollisten monimuuttujamenetelmien avulla. Näytteinä toimi 77 yksittäistä lajihunajanäytettä (kanerva-, nyhälaventeli-, leveälehtilaventeli-, timjami-, mesikaste- ja sekahunajia), jotka oli tunnistettu ennakkoon siitepölyanalyysin ja aistinvaraisen arvioinnin avulla. Etenkin trehaloosi-, erloosi-, meleltsitoosi- ja maltotriosoosipitoisuuksissa havaittiin olevan eroja eri lajihunajien välillä. Fruktuosi-glukoosisuhteen ei havaittu tässä tutkimuksessa olevan merkittävä lajihunajia erottava tekijä. Monimuuttuja-analyysin avulla luotuun malliin otettiin neljän mainitun hiilihydraatin lisäksi mukaan selittäviksi tekijöiksi myös isomaltoosi ja nigeruosi. Näiden kuuden käytetyn hiilihydraatin avulla pystyttiin erottamaan kanerva-, molemmat laventeli- sekä mesikastehunaja yli 90 %:n tarkkuudella toisistaan.

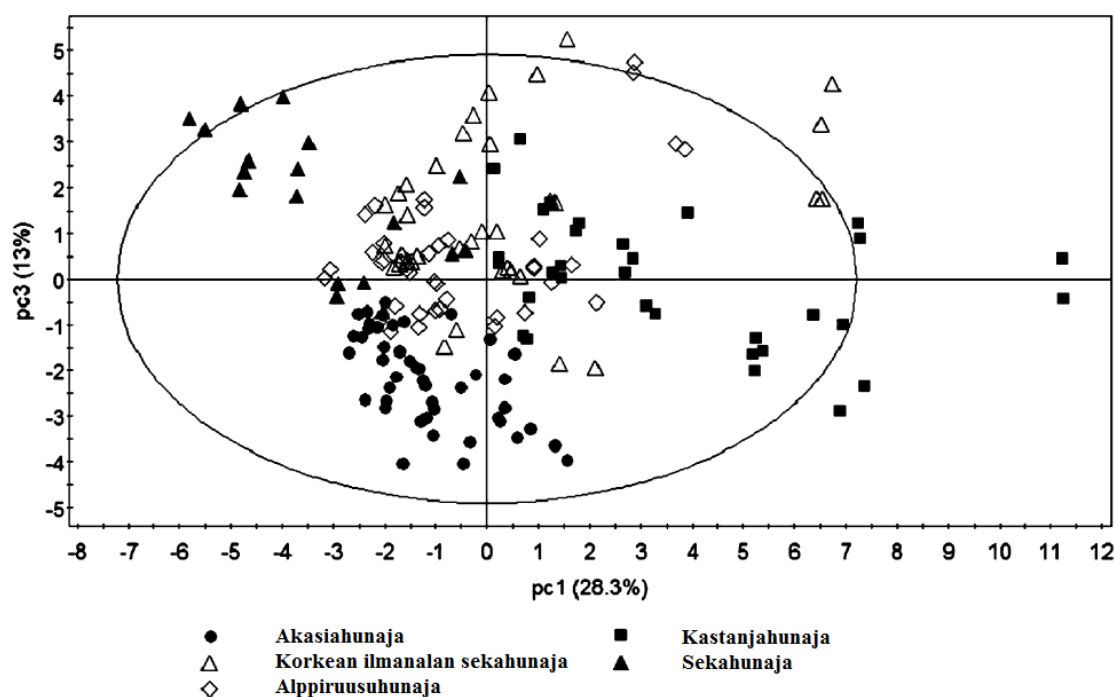
De la Fuente ym. (2011) tutkivat yli sadan espanjalaisen lajihunajan hiilihydraattiprofiileja GC-menetelmän avulla. Siitepölyanalyysin avulla tunnistetuista lajihunajista merkittävimpiä olivat kanerva-, eukalyptus-, rosmariinihunaja sekä sitrus-, neidonkieli- ja ruusukasviensukuisista kasveista peräisin olevat hunajat. Menetelmän avulla näytteistä pystyttiin tunnistamaan yli 30 eri hiilihydraattia. Tämän lisäksi näytteissä havaittiin vielä lähes kymmenen muuta tuntematonta trisakkaridia, mikä oli selvästi suurempi määrä kuin muissa vastaavissa tutkimuksissa. Glukoosin ja fruktoosin lisäksi merkittäviä hiilihydraatteja näytteissä olivat turanoosi, maltuloosi, isomaltoosi, maltoosi, kojibioosi, trehaloosi, trehaluloosi, erloosi, meleltsitoosi, raffinoosi sekä 1-kestoosi. Sakkaruosi-pitoisuus oli näytteissä hyvin pieni lukuun ottamatta muutamia sitrushunajanäytteitä, joissa suuren pitoisuuden syyksi arveltiin kyseisten hunajien lyhyttä kypsymisaikaa. PCA:n avulla pyrittiin luomaan erilaisia malleja, joiden avulla pystyttäisiin luokittelemaan kullekin lajihunajalle tyypilliset hiilihydraattiprofiilit ja erottamaan lajihunajat toisistaan. Sisäinen vaihtelu samaa lajihunajaa edustavien näytteiden välillä oli kuitenkin hyvin suurta, minkä vuoksi selkeitä eroja eri lajihunajien välillä oli vaikea löytää. Tämä johtui mm. siitä, että monessa lajihunajaksi luokitellussa näytteessä oli huomattava määrä merkkejä myös muiden kasvien siitepölystä, mikä saattoi lisätä vaihtelua hiilihydraattien pitoisuuksissa. Suuren lajien sisäisen vaihtelun vuoksi tutkimuksen perusteella hiilihydraattiprofiiliin perustuvaa hunajan botaanisen alkuperän määrittämistä ei pidetty hyödyllisenä menetelmänä. Sen sijaan tietyille lajihunajille tyypillisten yksittäisten hiilihydraattien avulla tapahtuvaa tunnistamista pidettiin varteenotettavana lisäkeinona muiden analyysien tueksi määritettäessä hunajan koostumusta ja alkuperää.

Anneli Salosen (2011) väitöskirjassa tutkittiin yhdeksän kotimaisen lajihunajan koostumusta mm. niiden aistinvaraisten ominaisuuksien, pH:n, sähkönjohtavuuden sekä erilaisten yhdisteryhmien kuten fenolisten yhdisteiden, aminohappojen ja hiilihydraattien pitoisuuksien avulla. Tutkittavia lajihunajia olivat tattari-, paju-, kanerva-, puolukka-, vadelma-, maitohorsma-, voikukka-, hilla- ja mesikastehunajat. Näytteistä mitattuja hiilihydraatteja olivat glukoosin ja fruktoosin lisäksi mm. sakkaroosi, turanoosi ja isomaltoosi. Näiden lisäksi käytetyllä menetelmällä havaittiin maltoosin ja trehaloosin sekä melelitoosin ja erloosin muodostamat kaksi yhteispiikkiä. Merkittävimmät erot eri hiilihydraattien pitoisuuksissa olivat maitohorsmahunajan suuri sakkaroosipitoisuus sekä paju- ja mesikastehunajasta mitatut suuret melelitoosin ja erloosin yhteispitoisuudet. Lisäksi mesikastehunajassa ei tutkimuksessa havaittu lainkaan maltoosin ja trehaloosin yhteispiikkiä, joka muissa lajihunajissa oli selvästi havaittavissa. Hiilihydraattipitoisuuksiin perustuvaa lajihunajien tunnistamista ei kuitenkaan pidetty toimivana menetelmänä, sillä mitatut hiilihydraattipitoisuudet eivät mainittuja poikkeuksia lukuun ottamatta eronneet merkittävästi eri lajihunajien välillä. Toisaalta näytteiden hiilihydraattipitoisuuksien määrittämiseen käytettiin HPLC-RI-tekniikkaa, jonka herkkyys ja selektiivisyys hiilihydraateille on huomattavasti huonompi verrattuna HPAEC-PAD-tekniikkaan (Corradini ym. 2012).

2.3.6 NMR-tekniikka ja hunajan hiilihydraattiprofiilin määrittäminen

Hunajan hiilihydraattien määrittämistä on tutkittu myös käyttäen ydinmagneettista resonanssia (NMR). Consonni ym. (2012) tutkivat italialaisten lajihunajien hiilihydraattiprofiileja käyttäen ¹H-NMR-tekniikkaa yhdistettynä tilastollisiin monimuuttujanalyysihin. Tutkimuksessa mukana olleet 86 näytettä olivat akasia-, kastanja-, alppiruusu- ja sekahunajia sekä korkeassa ilmanalassa tuotettuja sekahunajia. Näytteiden botaaninen alkuperä pyrittiin määrittämään 19:än eri hiilihydraatin avulla. Tutkimuksessa löydettiin kuitenkin melko vähän eri lajihunajien hiilihydraattiprofiileille tyypillisiä piirteitä. Kastanjahunajassa lähes kaikkien tutkittujen hiilihydraattien pitoisuudet olivat muita tutkittuja hunajia suurempia, kun taas akasihunajalle tyypillisenä nähtiin sen suuret fruktoosi- ja turanoosipitoisuudet. Lajihunajien hiilihydraattiprofiilien perusteella tehdystä PCA-mallista voidaan nähdä, että eri lajihunajien sijoittumisessa mallissa pystyttiin havaitsemaan joitakin eroja, mutta toisaalta myös lajihunajien sisäinen hajonta oli suurta (kuva 3). Etenkin alppiruusuhunaja ja korkean ilmanalan sekahunaja sekoittuivat mallissa,

minkä arvioitiin johtuvan näiden hunajien samanlaisista kasvu ympäristöistä. Jatkoanalyysinä suoritettu ortogonaalinen osittainen pienimmän neliösumman erotteluanalyysi (OPLS-DA) kuitenkin mahdollisti myös näiden hunajien sekä myös kahden erilaisen sekahunajan erottamisen toisistaan. Vaikka eri lajihunajien täydellinen erottaminen ei tutkimuksessa onnistunutkaan, nähtiin hiilihydraattiprofiileihin perustuvan botaanisen alkuperän määrittämisen olevan varteenotettava lajihunajien tunnistusmenetelmä etenkin yhdistettynä muihin määrittämenetelmiin.



Kuva 3. Consonnin ym. (2012) luoma PCA-malli, jossa on esitetty viiden tutkimuksessa mukana olleen eri lajihunajan yksittäisten näytteiden sijoittuminen niistä löydettyjen hiilihydraattipitoisuuksien perusteella.

Myös Kortensniemi ym. (2016) tutkivat hunajan botaanisen alkuperän määrittämisestä NMR-tekniikan ja tilastollisen monimuuttuja-analyysin avulla. Näytteinä tutkimuksessa käytettiin suomalaisia tattari-, voikukka-, kanerva-, sekakukka- ja mesikastehunajia, joiden lisäksi mukana oli yksittäisiä näytteitä suomalaisia jättipalsami-, lehmus-, puolukka- ja apilahunajia. Tutkimuksessa saatiin ^1H NMR-tekniikan avulla erotettua tattari-, voikukka-, kanerva- ja mesikastehunajat toisistaan niiden hiilihydraattiprofiilien perusteella. Hiilihydraateista meletsitoosi, glukoosi ja fruktoosi olivat merkittävimmät eroa aiheuttaneet hiilihydraatit ja ne selittivät 83 % varianssista erotteluun käytetyssä PCA-mallissa. Meletsitoosin vaikutus näkyi etenkin mesikastehunajan erottumisessa. Myös trehaloosipitoisuuden havaittiin aiheuttavan vaihtelua eri hunajalajien kesken.

Hiilihydraattien lisäksi eri lajihunajille pyrittiin löytämään muita tyypillisiä merkkiaineita, kuten orgaanisia happoja, joiden avulla lajihunajien karakterisointi olisi mahdollista. Apila-, lehmus- ja puolukkahunajista oli löydettävissä näille hunajille tyypillisiä yhdisteitä, joiden avulla myös niiden karakterisointi voi tulevaisuudessa olla mahdollista. Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden lukumäärä ($n=20$) oli kuitenkin melko pieni, minkä vuoksi tarkempien johtopäätösten tekemiseksi olisi tarpeen analysoida suurempi määrä näytteitä.

Suurin osa hunajanhiilihydraattiprofiileja käsittelevistä tutkimuksista koskee vain yhden maan tai tuotantoalueen hunajia. Alkuperäkasvin lisäksi myös hunajan tuotantoalueella voi olla vaikutusta sen hiilihydraattiprofiiliin, minkä vuoksi yksittäisen tuotantoalueen hunajille tehdyistä tutkimuksista on vaikea tehdä yleispäteviä hunajan koostumusta koskevia johtopäätöksiä. Lisäksi hunajan alkuperän selvittäminen vain yhden tekijän avulla voi olla erittäin hankalaa, minkä vuoksi luotettavin lopputulos saadaan yhdistelemällä useiden eri määrittämenetelmien avulla saatuja tuloksia. Esimerkiksi käyttämällä hunajasta mitattuja pH:ta, happamuutta sekä HMF-, tuhka- ja inverttisokeripitoisuuksia selittävinä tekijöinä on yritetty luoda malli, jonka avulla voitaisiin määrittää hunajan botaanista alkuperää (Sahinler ym. 2009). Kemiallisten ja fysikaalis-kemiallisten määritysten lisäksi myös hunajan aistinvaraisella arvioinnilla on edelleen tärkeä rooli selvitetessä sen alkuperää.

2.4 HPAEC-PAD ja hiilihydraattianalytiikka

Perinteisesti hiilihydraattien nestekromatografisessa määrittämisessä on käytetty silika-pohjaisia aminokolonneja sekä polymeeripohjaisia metallikyllästettyjä kolonneja yhdistettynä taitekerroin- ja ultraviolettisäteilydetektoreihin (RI- ja UV-detektorit) (Rohrer 2013). Näissä perinteisissä menetelmissä kuitenkin ongelmaksi muodostuu usein se, että ne ovat hyvin herkkiä eluentista ja näytematriisista aiheutuvalle taustakohinan voimistumiselle sekä vaativat esikäsittelynä tarkan näytteen puhdistuksen. RI-detektiossa ongelmana on myös, että gradienttisysteemien käyttö ei ole mahdollista. UV-detektiossa taas hiilihydraateille yleisesti käytetty aallonpituusalue 190–210 nm absorboi myös voimakkaasti orgaanisten liuottimien kuten asetonitriilin kanssa, mikä heikentää menetelmän selektiivisyyttä ja herkkyyttä hiilihydraateille (Corradini ym. 2012). Selektiivisyyttä voidaan parantaa muodostamalla hiilihydraatteihin johdoksiksi kromoforisia tai fluoresoivia ryhmiä. Ongelmana on kuitenkin, että elintarvikkeissa on

näytematriisissa usein mukana myös aminohappoja ja lipidejä, jolloin johdoksen muodostus toimii vain pelkistäville sokereille. HPAEC-PAD-tekniikka kehitettiin juuri hiilihydraattianalytiikka varten, sillä menetelmä mahdollistaa hiilihydraattien määrittämisen vähäisellä näytteen esikäsittelyllä ja ilman johdoksen muodostusta.

Pulssiamperometrinen detektio (PAD) tai pulssielektrokemiallinen detektio (PED) on voimakas menetelmä elektroaktiivisia ryhmiä sisältävien yhdisteiden, kuten hiilihydraattien, detektioon (Corradini ym. 2012). Amperometrinen detektio tapahtuu tyypillisesti kiinteällä anodilla, joka on joko kultaa, platinaa tai lasimaista hiiltä. Vaikka lasimaisesta hiilestä valmistettu elektrodi on yleisimmin käytössä oleva elektrodityyppi amperometrisessä detektiossa, ei sen käyttö hiilihydraattianalytiikassa ole mahdollista johtuen π -resonanssin puutteesta hiilihydraattien rakenteessa. Tämän vuoksi kulta on yleisesti hiilihydraattianalytiikassa käytetty elektrodimateriaali, sillä emäksisissä olosuhteissa kulta pystyy hapettamaan hiilihydraattien aldehydi- ja hydroksyyli-ryhmiä.

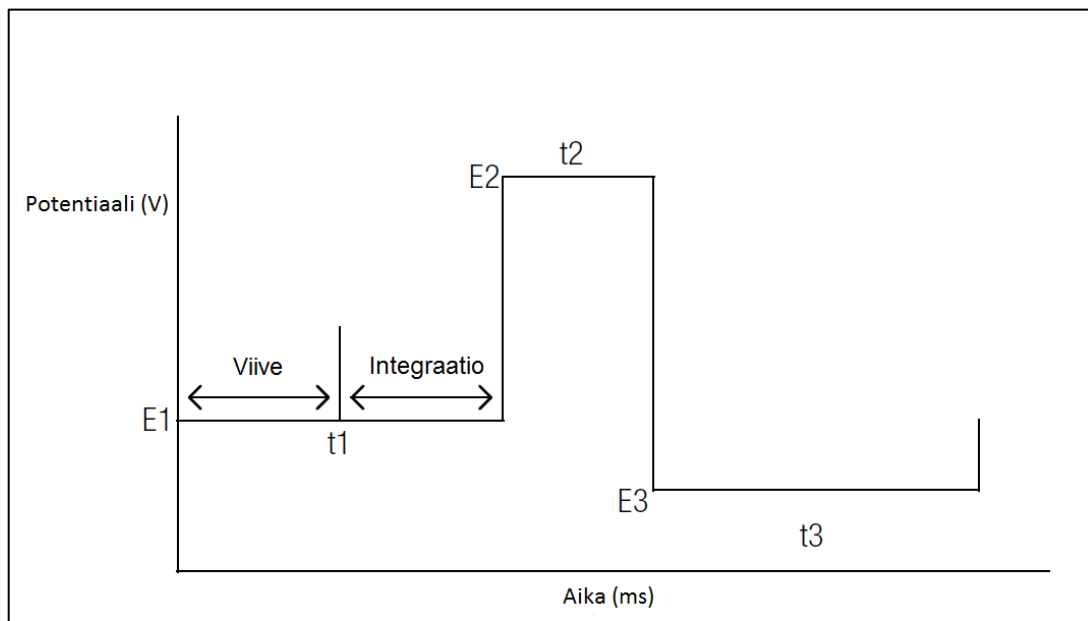
Monet hiilihydraatit ovat heikkoja happoja, joiden pKa-arvot vaihtelevat 12–14 (Corradini ym. 2012). Tämän vuoksi suurissa pH-arvoissa hiilihydraattien hydroksyyli-ryhmät hapettuvat osittain tai kokonaan oksianioniryhmiksi, mikä mahdollistaa niiden erottamisen anioninvaihtokromatografian avulla. Lisäksi pulssiamperometrisen detektorin herkkyys alditoleille sekä mono-, oligo- ja polysakkarideille kasvaa merkittävästi pH:n noustessa yli 12:en, joten analyyseissä käytettävän suuren pH:n avulla saavutetaan sekä menetelmän lisääntynyt herkkyys että kromatografian parantunut toiminta. Hiilihydraattien eluutioon vaikuttavia tekijöitä ovat hydroksyyli-ryhmien lukumäärä, anomeria, paikkaisomeria sekä polymerisaatioaste (DP). Esimerkiksi monosakkarideilla on useampia mahdollisesti ionisoituvia ryhmiä, mutta ryhmien välillä on eroa niiden happamuudessa. Glukoosin hydroksyyli-ryhmien happamuushierarkia esimerkiksi on seuraavanlainen: $1\text{-OH} > 2\text{-OH} \geq 6\text{-OH} > 3\text{-OH} > 4\text{-OH}$. Analyysissä mahdollisesti mukana olevat neutraalit ja kationiset yhdisteet eluoituvat tyypillisesti kuolleessa tilavuudessa tai hyvin lähellä sitä (Rohrer 2013). Tämän vuoksi ne eivät juurikaan pääse vaikuttamaan analyysiin, vaikka ne pystyisivätkin hapettumaan käytetyissä ajo-olosuhteissa. Suurten pH-arvojen käyttäminen perinteisissä hiilihydraattianalytiikan menetelmissä ei ole mahdollista, sillä niissä käytetyt silikakolonit eivät kestä suuria pH-arvoja. Suuret pH-arvot voivat kuitenkin aiheuttaa muutoksia hiilihydraateissa, kuten Lobry de Bruyn-van Ekenstein-transformaation kautta tapahtuvaa epimerisaatiota tai keto-enolitaautomeriaa, mikä saattaa teoriassa aiheuttaa häiriötä niiden määrittämisessä. Toisaalta monet näistä reaktioista tapahtuvat hyvin hitaasti

huoneenlämmössä, minkä vuoksi ne eivät ehdi merkittävästi häiritsemään kromatografiaa tavallisesti käytettyjen analysointiaikojen puitteissa.

CarboPac PA1 on yleisesti käytetty kolonni mono- ja disakkaridien sekä joidenkin oligosakkaridien erottamisessa, johtuen kolonnin suuresta selektiivisyydestä näille analyyteille (Thermo Fisher Scientific 2013). Kolonnin stationäärifaasina toimii helmimäisistä monomeereista koostuva ei-huokoinen polymeeriharts (Thermo Scientific™ Dionex™ MicroBead™), jossa on 5 % ristosidottuja kvaternäärisiä ammoniumryhmiä. Stationäärifaasi on stabiili hyvin laajalla pH-välillä (0-14) sekä kestää hyvin mekaanista rasitusta (Rohrer 2013). Muita HPAEC-PAD-menetelmissä yleisesti käytettyjä kolonneja ovat mm. CarboPac PA100, joka soveltuu etenkin pidempiketjuisten oligosakkaridien määrittämiseen, sekä CarboPac MA1, joka on suunniteltu erityisesti sokerialkoholien analysoimiseen.

PAD mahdollistaa hiilihydraattien detektion jopa 10 pmol-tasolla ilman johdosten muodostamista näytteisiin (Rohrer 2013). Varsinainen detektio perustuu hiilihydraattien hapettumiseen kultaelektrodilla ja siitä syntyvään virran muutokseen. Tämä hapettuminen on kuitenkin haitallista elektrodille, minkä vuoksi se vaatii puhdistuksen mittausten välillä. Tämä tapahtuu nostamalla elektrodin potentiaalia, mikä aiheuttaa kultaelektrodin hapettumisen ja hiilihydraattien hapettumistuotteiden irtoamisen elektrodin pinnalta. Lopuksi elektrodin potentiaalia lasketaan, jotta hapettunut pinta saadaan pelkistettyä takaisin reaktiiviseksi kultaelektrodiksi. Syklin eri vaiheet on esitetty kuvassa 4. Kaikki kolme syklistä käytettyä potentiaalia ovat menetelmän toiminnan kannalta merkittäviä, mutta varsinaisen mittauksen kannalta tärkein on ensimmäinen potentiaali (E_1). Puhdistuspotentiaalin (E_2) tulee olla tarpeeksi E_1 -potentiaalia suurempi, jotta hiilihydraattien hapettumistuotteet saadaan varmasti poistettua elektrodin pinnalta. Toisaalta liian suuri potentiaali aiheuttaa elektrodissa ylimääräistä kulumaa ja vähentää sen käyttöikää. Uudemmissa laitteistoissa puhdistuspotentiaali voidaan vielä jakaa kahteen osaan, jolloin ensimmäiseksi potentiaali lasketaan hyvin negatiiviseksi ja nostetaan tämän jälkeen takaisin positiiviseksi. Kolmannen potentiaalin (E_3) tulee taas olla tarpeeksi matala elektrodin pelkistämiseksi, mutta toisaalta liian alhainen potentiaali voi aiheuttaa esimerkiksi hapen pelkistymistä vetyperoksidiksi, mikä taas aiheuttaa ongelmia määrittelyyn. Jokaisen vaiheen jännite on yleensä joitakin mikrovoltteja ja vaiheiden pituudet muutamia millisekunteja. Tavallisesti potentiaalit E_1 ja E_2 ovat jännitteeltään positiivisia, kun taas E_3 -pelkistyspotentiaalin tulisi olla jännitteeltään negatiivinen. Ensimmäisen vaiheen alussa on lisäksi ns. viiveosa ennen varsinaista detektiota, jotta

pelkistysvaiheen jälkeinen jännitemuutos ei pääse vaikuttamaan yhdisteiden detektioon. Jännitteiden ja niiden kestot tule optimoida jokaiselle menetelmälle sopiviksi ja aihetta on käsitelty kattavasti mm. LaCoursen ja Johnsonin (1993) artikkelissa.

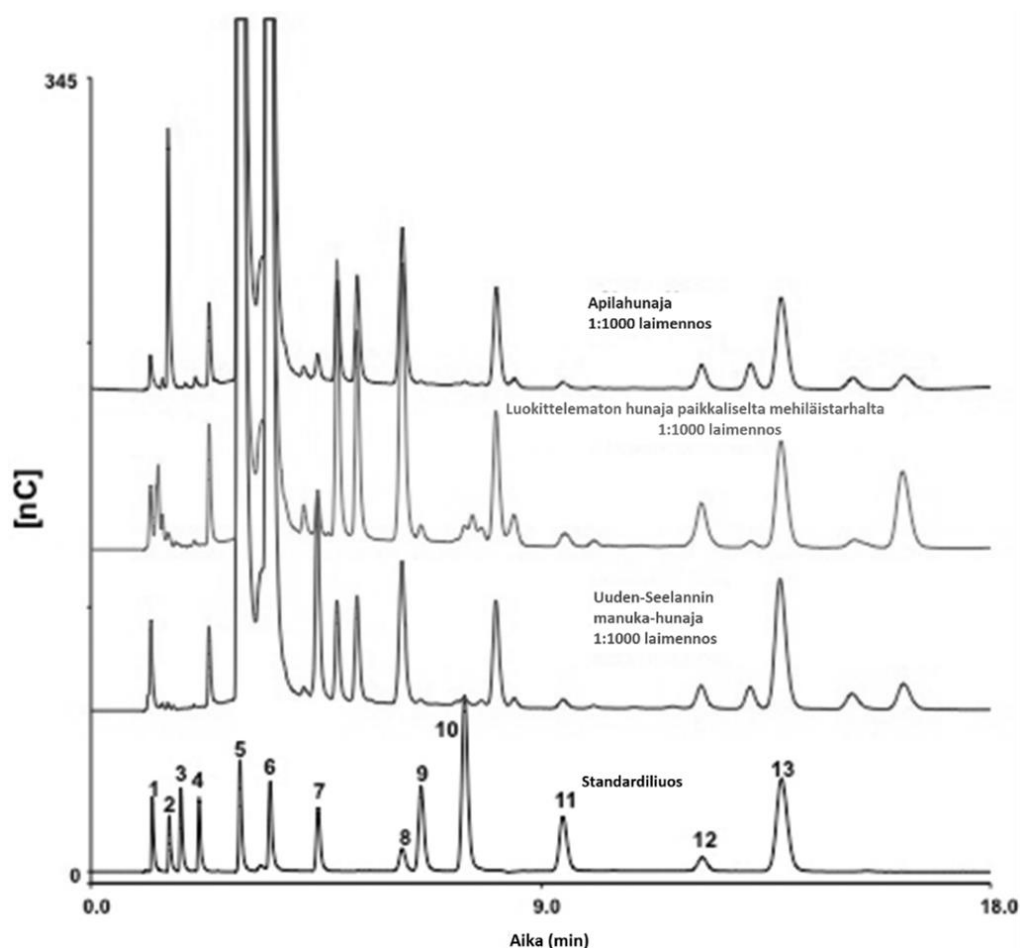


Kuva 4. Perinteisen pulssiamperometrisessä detektiossa käytetyn potentiaalisyklin kaavioesitys. Syklin ensimmäinen potentiaali (E1) on jaettu viive- ja integraatiovaiheisiin, joita seuraa puhdistuspotentiaali (E2) sekä pelkistyspotentiaali (E3). Potentiaalien vastaavat kestot ovat t1, t2 ja t3.

2.5 PCA:n käyttö lajihunajien erottamiseksi

PCA on matemaattinen menetelmä, jonka avulla voidaan uudelleenorganisoida näytejoukosta saatua alkuperäistä tulosaineistoa (Davies ja Fearn 2005). Erityisen käyttökelpoiseksi PCA muodostuu silloin, kun näytejoukkoa määrittävien muuttujien määrä kasvaa suureksi. PCA muodostaa alkuperäisessä tulosaineistossa käytettävien muuttujien perusteella uusia pääkomponentteja, jotka selittävät pääosan aineiston sisältämästä vaihtelusta. Näin muodostettujen uusien muuttujien avulla sama aineisto pystytään selittämään alkuperäistä huomattavasti yksinkertaisemmassa muodossa pienemmän muuttujamäärän avulla. Lisäksi PCA:n avulla pystytään vähentämään erilaisista virhelähteistä aiheutuvaa tulosaineiston taustakohinaa ja näin paremmin löytämään haluttu informaatio koko aineistosta. Periaate PCA:n takana on hyvin yksinkertainen, vaikka matemaattiset lainalaisuudet sen takana ovat monimutkaiset.

Etenkin hunajan alkuperän tutkimisen yhteydessä on tyypillisesti käytetty hyväksi PCA:ta, jonka avulla voidaan tutkia useiden eri tekijöiden yhteisvaikutusta saatuihin mittaustuloksiin. PCA:n avulla voidaan esimerkiksi yrittää luokitella lajihunajia niiden hiilihydraattiprofiilien perusteella. Hunajien hiilihydraattiprofiileille on usein tyypillistä, että eri lajihunajat sisältävät samoja hiilihydraatteja, mutta niiden suhteelliset pitoisuudet vaihtelevat (kuva 5), minkä avulla voidaan pyrkiä löytämään kullekin lajihunajalle tyypillinen hiilihydraattiprofiili (Swallow ja Low 1990; Rohrer ym. 2016). Yksittäisten hiilihydraattien pitoisuuksien vertaileminen eri hunajanäytteiden välillä käyttäen perinteisiä tilastollisia analyysimenetelmiä, kuten Studentin t-testiä tai varianssianalyysiä, on hyvin työlästä eikä aina anna kattavaa kokonaiskuvaa kaikkien eri tekijöiden yhteisvaikutuksesta. Tämän vuoksi erilaisten monimuuttuja-analyysien käyttäminen tällaisen aineiston käsittelyssä on lähes välttämätöntä.



Kuva 5. Kolmen eri lajihunajan (apila-, manuka- ja luokittelematon paikallinen hunaja) hiilihydraattiprofiilit kromatogrammeina esitettynä. Kuvasta voidaan nähdä, että eri lajihunajissa esiintyy lähes samat hiilihydraatit, mutta niiden pitoisuuksissa on selvää vaihtelua (Rohrer ym. 2016). Standardiliuoksessa käytetyt hiilihydraatit olivat: fusitoli (1), trehaloosi (2), fukoosi (3), ramnoosi (4), glukoosi (5), fruktoosi (6), sakkaroosi (7), kojibioosi (8), meletsitoosi (9), gentiobioosi (10), 1-kestoosi (11), nigeroosi (12) ja maltoosi (13).

PCA-mallien avulla on yritetty luoda erilaisia kirjastoja, joissa eri lajihunajat on luokiteltu ja erotettu esimerkiksi niiden hiilihydraattiprofiilien (Nozal ym. 2005; De la Fuente ym. 2011) tai useampien eri tekijöiden yhteisvaikutuksen perusteella (Sahinler ym. 2009; Jandrić ym. 2015), jolloin tuntemattoman hunajan näytteen alkuperä olisi mahdollista selvittää vertaamalla siitä saatuja mittaustuloksia näihin valmiiksi luotuihin malleihin. Tällaisten kattavien kirjastojen luominen on kuitenkin hyvin haastavaa, sillä kirjaston luomiseksi tarvittava yksittäisten näytteiden määrän tulee olla riittävän suuri, jotta luonnollisesta varianssista johtuva vaihtelu ei vaikuttaisi liikaa luodun monimuuttujamallin rakenteeseen ja tuntemattomien näytteiden tunnistaminen olisi mahdollisimman luotettavaa.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 Tutkimuksen tavoite

Kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli kehittää HPAEC-PAD-menetelmä, jonka avulla hunajassa olevat hiilihydraatit on mahdollista erottaa toisistaan. Menetelmän avulla pyrittiin määrittämään tutkimuksessa käytetyistä kotimaisista laji- ja sekahunajista niissä esiintyvien hiilihydraattien pitoisuudet. Näytteissä olleiden hiilihydraattien tunnistamiseen käytettiin standardeina 16:tta kirjallisuudessa aiemmin hunajassa havaittua hiilihydraattia, joiden avulla pyrittiin luomaan kaikille näytteille omat hiilihydraattiprofiilit. Näiden profiilien väliset erot pyrittiin saamaan selville käyttäen hyväksi PCA:ta, jonka avulla eri lajihunajat pyrittiin lisäksi ryhmittelemään ja erottamaan toisistaan niiden botaanisen alkuperän mukaan.

3.2 Materiaalit ja menetelmät

3.2.1 Laitteisto

Laitteistona työssä toimi neljällä pumpulla ja 10 µl:n injektiooopilla varustettu Alliance 2690 Separation Module (Waters, USA) sekä siihen kytketty Watersin 2465 elektrokemiallinen detektori (Waters, USA). Laitteiston ohjelmistona käytettiin kahta eri Empower-ohjelmistoverisota (Empower 3, Build No. 3471 ja Empower 2, Build No. 2154,

Waters, USA). Kahta eri ohjelmistoversiota jouduttiin käyttämään, koska uudemmassa versiossa olleen ohjelmistovirheen vuoksi ohjelma aiheutti ajosarjojen satunnaisen katkeamisen. Detektorin virtauskennossa käytettiin 3 mm:n Au WE -kultaelektrodia sekä vertailuelektrodina Hy-REF-vetyelektrodia. Detektorin pulssipotentialit (E) ja -kestot (t) olivat $E_1 = +0,15$ V, $t_1 = 400$ ms, $E_2 = +0,75$ V, $t_2 = 120$ ms, $E_3 = -0,80$ V, $t_3 = 130$ ms, $t_s = 20$ ms. Potentiaalien valinnassa pohjana käytettiin Pastellin (2010) väitöskirjassa käytettyä HPAEC-PAD-menetelmää. Kolonnina käytettiin Dionex CarboPac PA1 -anioninvaihtokolonnia (4 x 250 mm) ja siihen liitettyä CarboPac PA1 -esikolonnia (4 x 50 mm) (Thermo Fisher, USA). Kolonniuunin lämpötila oli tutkimuksessa 35 °C. Menetelmän kehitysvaiheessa käytettiin myös post column -pumppuna Watersin 515 HPLC-pumppua (Waters, USA), jota ei kuitenkaan otettu käyttöön lopulliseen menetelmään.

3.2.2 Reagenssit ja ajoliuokset

Kaikki tutkimuksessa käytetty vesi oli Millipore-laitteistolla puhdistettua Milli-Q-vettä (Millipore Corp, USA). Natriumhydroksidiliuokset valmistettiin laimentamalla 1 N natriumhydroksidia (NaOH) (Acros Organics, Irlanti) veteen. Lisäksi käytettiin natriumasetaattia (NaOAc) kolmannessa ajoliuoksessa (Merck KGaA, Darmstadt Saksa). Ajoliuos A oli puhdasta Milli-Q-vettä. Ajoliuos B valmistettiin laskemalla mittapulloon ensin Milli-Q-vettä, minkä jälkeen pulloon pipetoitiin NaOH ja pipetin kärki huuhdeltiin mittapullossa. Lopuksi mittapullo täytettiin merkkiin vedellä ja sekoituksen jälkeen liuos suodatettiin 0,45 µm:n HVLP-suodattimen (Merck Millipore Durapore ®, Irlanti) läpi. Ajoliuos C valmistettiin punnitsemalla natriumasetaattia muoviselle punnitusalustalle, jolta se siirrettiin veden avulla kvantitatiivisesti mittapulloon ja liuotettiin veteen. Tämän jälkeen pipetoitiin mittapulloon NaOH, kuten ajoliuos B:ssä, täytettiin pullo merkkiin vedellä ja liuos suodatettiin 0,45 µm:n HVLP-suodattimen (Millipore Durapore ®, Tullagreen Carrigtwohill, Irlanti) läpi.

3.2.3 Näytteet ja niille suoritettut esitutkimukset

Näytteinä työssä käytettiin Suomessa tuotettuja laji- ja sekahunajia. Hunajat oli tuotettu ja kerätty vuosien 2012 ja 2016 välisenä aikana. Suuri osa näytteistä oli peräisin edellisten vuosien Suomen paras hunaja -kilpailuista, joissa niille oli suoritettu siitepölyanalyysit

sekä aistinvarainen arviointi Suomen Mehiläishoitajain Liiton toimesta (taulukko 2). Osasta näytteistä oli myös mitattu niiden sähköjohtavuus.

Taulukko 2. Työssä tutkituille lajihunajanäytteille suoritettut ulkopuoliset analyysit: (+) esitutkimus suoritettu näytteelle.

Lajihunaja	Näytetunnus	Siitepölyanalyysi	Aistinvarainen arviointi	Sähköjohtavuus
Tattari	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	
	D	+	+	
	E			
Mesikaste	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	
	D			
	E	+	+	+
Kanerva	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	
	D	+	+	
	E	+	+	
Sekakukka	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	
	D	+	+	
Puolukka	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	+
Voikukka	A	+	+	
	B	+	+	
	C	+	+	
Lehmus	A	+	+	
	B			
Hilla	A	+	+	
	B	+	+	
Apila		+	+	
Valkomesikkä		+	+	
Jättipalsami		+	+	
Horsma		+	+	

Näytteistä 26 saatiin lahjoituksena Turun yliopistolta. Lisäksi neljä näytettä saatiin lahjoituksena Suomen Mehiläishoitajain Liitolta. Kolme lajihunajanäytettä ostettiin helsinkiläisestä kaupasta. Laboratorion omaksi vertailunäytteeksi valittiin vielä erillinen kaupallinen sekahunaja. Näytteet säilytettiin Evirassa jääkaapissa valolta suojattuna alle +5 °C:n lämpötilassa.

Näytteistä oli siitepölyanalyysissä laskettu n. 400 siitepölyhiukkasta, jotka oli tunnistettu ja lajiteltu niiden kasvialkuperän perusteella. Lasketuista siitepölymääristä voidaan nähdä, että yhdessäkään lajihunajanäytteessä merkityn kasvilajin siitepöly ei ollut näytteessä vallitsevana siitepölynä. Eri lajihunajien merkittyyjä kasvilajeja vastaavien siitepölyhiukkasten määrät vaihtelivat näytteissä 3–144. Pelkkä siitepölyhiukkasten määrä ei kuitenkaan täysin korreloi hunajan valmistamiseen käytetyn meden määrän kanssa, sillä eri kasvilajien hunajaan päätyvissä siitepölymääriä voi olla suuriakin eroja (Salonen 2011). Tämän vuoksi myös aistinvaraisella arvioinnilla on tärkeä rooli tunnistettaessa erilaisia lajihunajia, sillä hunajan maku, väri ja aromi voivat olla lajihunajalle tyypillisiä, vaikka laskettu siitepölymäärä olisikin pieni.

Tattarihunajanäytteistä lasketut siitepölymäärät vaihtelivat 7–70. Aistinvaraisessa arvioinnissa näytteistä löytyi tattarihunajalle tyypillisiä makuja ja aromeja, mikä puolsi niiden tattarialkuperää. Tosin näytteistä löytyi paljon siitepölyjä myös muista kasveista, jotka ovat hyviä siitepölyntuottajia, minkä vuoksi näytteet eivät välttämättä olleet puhtaita tattarihunajia. Vain yhdelle tattarihunajanäytteistä (näyte E) ei ollut suoritettu siitepölyanalyysiä tai aistinvaraista arviointia, joten tämän näytteen botaanisesta alkuperästä ei ollut varmuutta.

Mesikastehunajassa siitepölyhiukkasten avulla ei voida arvioida hunajan mesikastealkuperää vaan arviointi suoritetaan muiden mesikastehunajalle tyypillisten ominaisuuksien avulla. Tutkitut näytteet sisälsivät enimmäkseen runsaasti mesikastemerkkejä ja myös aistinvarainen arviointi tuki pääosin niiden alkuperää. Vain yksi mesikastenäyte (näyte E) ei sisältänyt juurikaan mesikastemerkkejä. Sen sähköjohtavuus oli myös selvästi alle suomalaisten mesikastehunajien keskiarvon ja hyvin lähellä tattarihunajien suomalaista keskiarvoa. Näyte sisälsi melko paljon tattarin siitepölyhiukkasia ja se muistutti aistinvaraisessa arvioinnissa hyvin paljon tattarihunajaa. Yhdelle mesikastenäytteistä (näyte D) ei ollut suoritettu siitepölyanalyysiä tai muita esitutkimuksia.

Kanervahunajanäytteistä lasketut siitepölyhiukkasten määrät vaihtelivat 14–85. Vaikka osassa näytteissä kanervan siitepölymäärät olivat pieniä, tukivat aistinvaraiset

ominaisuudet niiden kanerva-alkuperää. Puolukkahunajanäytteistä *vaccinium*-ryhmän lasketut siitepölymäärät vaihtelivat 33–144. Siitepölymäärät olivat muihin tutkimuksessa mukana olleisiin näytteisiin verrattuna melko suuret, mutta näytteiden aistinvaraisten ominaisuuksien perustella näytteet eivät aivan täyttäneet puolukkahunajalle asetettuja kriteereitä. Lisäksi yhdestä näytteestä (näyte C) mitattu sähkönjohtavuus oli pienen siitepölymäärän lisäksi selvästi alle puolukkahunajien keskiarvon. Voikukkahunajanäytteissä voikukan siitepölyhiukkasten määrät vaihtelivat 3–10. Yksi voikukkahunajanäyte (näyte A) sisälsi vain yksittäisiä voikukan siitepölyhiukkasia, minkä lisäksi näyte oli jo käymistilassa, mikä vaikeutti sen aistinvaraista arviointia ja hunajan varmempaa luokittelua. Voikukissa on paljon siitepölyttömiä lajeja, mikä voi osaltaan selittää kaikissa voikukkanäytteissä olleita vähäisiä siitepölymääriä, eikä pieniä siitepölymääriä voida suoraan pitää merkinä väärästä botaanisesta alkuperästä.

Suolta kerätyistä hillahunajanäytteistä oli molemmista laskettu vain 14 hillan siitepölyhiukkasta, mutta toisaalta myös muut näytteistä lasketut siitepölyhiukkaset olivat peräisin tyypillisistä suoalueen kasveista. Lisäksi aistinvaraiset ominaisuudet olivat molemmissa näytteissä hillahunajalle tyypillisiä. Vain toiselle lehmushunajanäytteistä (näyte A) oli suoritettu siitepölyanalyysi sekä aistinvarainen arviointi. Näytteessä oli laskettu 120 lehmuksen siitepölyä, minkä lisäksi myös aistinvarainen arviointi tuki näytteen lehmusalkuperää. Apilahunajanäytteestä eri apilalajikkeista peräisin olevien siitepölyhiukkasten määrä oli 271. Hunajassa oli kuitenkin myös lehmuksen aromia, vaikka koostumus ei muuten vastannut lehmushunajaa eikä lehmuksen siitepölyä löytynyt paljoa. Saatteessa todettiin, että pienikin määrä voimakasaromista lehmusta voi vaikuttaa miedon apilahunajan aromiin, minkä vuoksi hunajaa voitiin melko varmasti pitää apilahunajana.

Horsmanäytteestä oli laskettu vain 12 horsman siitepölyhiukkasta. Saatteessa kuitenkin todettiin, että horsman siitepöly on suurikokoista ja sitä kulkeutuu meden mukana vain vähän hunajaan. Tämän vuoksi horsman mettä oli todennäköisesti käytetty runsaasti hunajan valmistuksessa, vaikka horsman siitepölyn määrä oli pieni. Hunaja oli myös kiteytynyt, minkä lisäksi siinä oli myös havaittavissa merkkejä vadelmakasveista ja apilasta. Esitutkimusten perusteella näytettä ei voitu pitää täysin puhtaana horsmahunajana. Jättipalsaminäytteestä oli laskettu noin 100 eri palsamikasveista peräisin olevaa siitepölyhiukkasta. Näytteestä löytyi myös hieman yleensä harvinaista horsman siitepölyä, minkä vuoksi hunajan valmistuksessa on käytetty todennäköisesti myös horsman mettä. Hunaja arveltiin olevan ristikukkaisten, palsamin ja horsman meden yhdistelmästä

valmistettua. Valkomesikkänäytteestä oli laskettu 11 eri mesikkäkasveista peräisin olevaa siitepölyhiukkasta. Aistinvaraisessa arvioinnissa oli havaittavissa merkkejä mesikkään aromeista, mutta näytteestä laskettu suuri muista hyvistä medentuottajakasveista peräisin olevan siitepölyn määrä viittaisi siihen, että kyseessä ei ollut aivan puhdas mesikkähunaja. Sekakukkanäytteille suoritettujen siitepölyanalyysien perusteella näytteet olivat kaikki sekahunajia.

3.2.4 Näytteiden käsittely

Jokaista hunajanäytettä punnittiin n. 0,5 g kolmena rinnakkaisnäytteenä 50 ml:n mittapulloihin, minkä jälkeen näytteet liuotettiin veteen ja mittapullot täytettiin merkkiin vedellä. Tämän jälkeen jokaisesta mittapullostä otettiin talteen n. 15 ml hunajaliuosta muovisiin säilytysputkiin, jotka varastoitiin jääkaappiin HPAEC-PAD-analyysiin asti. Varastoiduista hunajaliuoksista tehtiin lopuksi Milli-Q-veteen 1:5- ja 1:200-laimennokset, jotka ruiskusuodatettiin HPLC-ajopulloihin 0,45 µm:n PVDF-suodattimen (Merck Millipore Millex ®, Tullagreen Carrigtwohill, Irlanti) läpi.

3.2.5 Standardit

Hiilihydraattien tunnistamiseksi käytössä oli 16 erilaista mono-, di- ja trisakkaridi-standardia: D-(+)-glukoosi (Sigma-Aldrich, Ranska), D-(+)-fruktoosi (Sigma-Aldrich, USA), sakkaroosi (Sigma-Aldrich, USA), L-ramnoosi (Sigma-Aldrich USA), D-(+)-maltoosimonohydraatti (Sigma-Aldrich, Japani), D-(+)-turanoosi (Sigma-Aldrich, Tšekki), D-(+)-meletsitoosimonohydraatti (Sigma-Aldrich, Sveitsi), β-gentiobioosi (Sigma-Aldrich, USA), 1-kestoosi (Sigma-Aldrich, Belgia), L-(-)-fukoosi (Sigma-Aldrich, Slovakia), nigeroosi (Sigma-Aldrich, Iso-Britannia), D-(+)-raffinoosi (Sigma-Aldrich, USA), trehaloosidihydraatti (Sigma-Aldrich, Sveitsi), isomaltoosi (Sigma-Aldrich, Israel), L-fusitoli (Santa Cruz Biotech, Dallas, USA) ja kojibioosi (ChemCruz, USA). Hiilihydraattistandardien rakenteet on esitetty kuvassa 1. Kidevedettömiä hiilihydraattistandardeja punnittiin tasan 10 mg 20 ml:n mittapulloihin, paitsi fukoosi- ja nigeroosi-standardieja, joita punnittiin tasan 5 mg 10 ml:n mittapulloihin. Maltoosi- ja meletsitoosimonohydraatteja punnittiin molempia 10,5 mg ja trehaloosidihydraattia 11,1 mg 20 ml:n mittapulloihin. Punnitut standardit liuotettiin Milli-Q-veteen. Lopuksi näistä

kantaliuoksista valmistettiin Milli-Q-veteen seos, jossa jokaisen hiilihydraatin pitoisuus oli tasan 25 µg/ml. Lisäksi jokaisesta yksittäisestä hiilihydraattikantaliuoksesta valmistettiin laimennos, jonka pitoisuus oli 25 µg/ml. Näiden laimennosten avulla selvitettiin hiilihydraattien eluoitusjärjestys standardiseoksessa. Lopuksi standardiseoksen avulla tunnistettiin hunajanäytteissä olleet hiilihydraatit.

Hiilihydraattien kvantifioimiseksi määritettiin standardisuorat kolmena eri päivänä. Suorat ajettiin niille hiilihydraattistandardeille, joiden erottuminen standardiseoksessa oli riittävä ja jotka pystyttiin kvantifioimaan hunajanäytteistä. Suorista laskettiin suoranyhtälöt sekä korrelaatiokertoimet (R^2). Suorien määrittämiseksi käytetyt standardien pitoisuudet olivat 0,5–40 µg/ml ja suoran muodostamiseen käytettiin standardista riippuen 4-5 eri pitoisuutta.

Hiilihydraattistandardien määrittämisen lisäksi kokeiltiin menetelmän soveltuvuutta HMF:n määrittämiseen hunajanäytteistä. Menetelmän soveltuvuus HMF:n määrittämiseen selvitettiin analysoimalla HMF-standardia (pitoisuus 0,01 µg/ml) käytetyllä ajo-ohjelmalla ja seuraamalla sen aiheuttamaa vastetta kromatogrammissa.

3.2.6 Menetelmän toimivuuden määrittäminen

Yhdisteiden toteamis- ja määritysrajat laskettiin standardisuoriin käytettyjen laimennosten avulla. Toteamisrajaksi valittiin pitoisuus, joka oli 3 kertaa pohjaviivan taustakohina. Määritysraja laskettiin kertomalla toteamisraja kolmella. Saantokoe tehtiin laboratorion omalla sekahunajavertailunäytteellä. Kokeessa injektointiin kahtena eri päivänä vertailunäytteen kantaliuoksen 1:5-laimennoksia kuutena rinnakkaisena määrittämisnä. Vastaavasti kuutena rinnakkaisena näytteenä injektointiin vertailunäytteen kantaliuoksen 1:5-laimennoksia, joihin oli lisätty 10 µg/ml pitoisuutena fusitoli-, raffinoosi-, turanoosi- ja maltoosikantaliuoksia. Menetelmän oikeellisuus määritettiin myös käyttämällä hyväksi saantokokeista saatuja tuloksia. Toistettavuus määritettiin laskemalla kahtena eri päivänä kuutena rinnakkaisnäytteenä injektoidun vertailunäytteen hiilihydraattien keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet. Uusittavuus laskettiin vertaamalla usealta eri päivältä saatujen vertailunäytteen injektoiden tuloksia. Spesifisyys laskettiin injektoidulla ajoliuoksia B ja C käytetyllä ajo-ohjelmalla ja tarkistamalla, aiheutuuko ajoliuoksista häiriötä määrittämiselle. Selektiivisyys määritettiin laskemalla standardiseoksen hiilihydraattien piikkien resoluutiot. Standardiseoksesta saatujen vasteiden avulla laskettiin seoksen hiilihydraateille retentiotekijä (k), resoluutio (R) ja erotustekijä (α) alla olevien seuraavien kaavojen avulla (kuva 6).

$$k = t'_R / t_M$$

$$R = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{0,5(W_{bA} + W_{bB})}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Kuva 6. Retentiotekijän (k), resoluution (R) ja erotustekijän (α) laskemiseksi käytetyt kaavat. Muut kaavoissa käytetyt lyhenteet: retentioaika (t_R), todellinen retentioaika (t'_R) sekä piikin pohjan leveys kromatogrammissa (W_b).

Jokaisen näytteen kolmesta rinnakkaisnäytteestä mitattujen hiilihydraattien pitoisuuksia verrattiin keskenään käyttäen Dixonin Q-testiä, jotta mahdolliset mittausvirheestä johtuvat poikkeavat mittaustulokset saatiin poistettua tulosten jatkokäsittelystä. Testissä yksittäisten hiilihydraattien mittaustulokset asetettiin nousevaan järjestykseen pienimmästä arvosta alkaen ($X_1 < X_2 < \dots < X_{N-1} < X_N$) ja laskettiin tulosten perusteella Q-arvo (kuva 7). Hylkäystasoksi valittiin 95 %:n luottamustaso, mikä kolmen näytteen Q-testissä tarkoitti, että Q-arvon ylittäessä 0,970 jätettiin kahdesta muusta arvosta eroava arvo pois tulosten jatkokäsittelystä poikkeavana havaintona (Rorabacher 1991).

$$(1) Q_{exp} = \frac{X_2 - X_1}{X_N - X_1} \qquad (2) Q_{exp} = \frac{X_N - X_{N-1}}{X_N - X_1}$$

Kuva 7. Dixonin Q-testin laskemiseksi käytetyt kaavat, kun epäilty poikkeava havainto oli lukusarjan pienin luku (1) tai epäilty poikkeava havainto oli lukusarjan suurin luku (2).

3.2.7 Menetelmän kehittämisen vaiheet

Menetelmän kehitys aloitettiin Pastellin (2010) käyttämän HPAEC-PAD-menetelmän olosuhteiden pohjalta. Kehityksessä yksittäinen injektio jaettiin kolmeen eri osaan: alun erottamisosaan, jossa tapahtui analyyttien erottuminen ja eluutio, tämän jälkeen tapahtuvaan kunnostusosaan, jossa ajoliuoksen NaOH-pitoisuus suureni kolonnin kunnostamiseksi, sekä lopun tasapainotusosaan, jossa kolonni tasapainotettiin takaisin alkutilaan seuraavaa injektiota varten. Menetelmässä käytettävä virtausnopeus, eri osien pituudet sekä niissä käytetyt NaOH-pitoisuudet pyrittiin optimoimaan siten, että yhdisteiden resoluutio saatiin maksimoitua ja yksittäiseen injektioon kuluva aika pysyi riittävän lyhyenä.

Menetelmän kehittäminen aloitettiin käyttämällä erottamis- ja tasapainotusosassa 5–20 mM NaOH-pitoisuuksia sekä kunnostusosassa 50–200 mM NaOH-pitoisuuksia (taulukko 3). Tässä vaiheessa erottamisosan NaOH-pitoisuuden pienentämisen havaittiin parantavan yhdisteiden resoluutiota. Toisaalta erottamisosan NaOH-pitoisuuden pienentäminen aiheutti pohjaviivan nousua kromatogrammissa, mikä ei ollut toivottavaa. Lisäksi tätä kompensoimaan käytetyt kunnostusosan suuret NaOH-pitoisuudet nostivat kunnostuksen jälkeen pohjaviivan korkealle, minkä vuoksi tasapainotusosan pituus kasvoi huomattavasti. Tämän vuoksi kunnostusosan NaOH-pitoisuutta jouduttiin pienentämään.

Taulukko 3. Menetelmän kehitysvaiheen ensimmäiset ajokokeilut: (*) post column -pumpun virtausnopeus 0,3 ml/min ja NaOH-pitoisuus 300 mM.

Virtausnopeus (ml/min)	Post column - pumppu	Erottamisosa		Kunnostusosa		Tasapainotusosa	
		c _{NaOH} (mM)	kesto (min)	c _{NaOH} (mM)	kesto (min)	c _{NaOH} (mM)	kesto (min)
1,0	ei	20	25	150	5	20	15
0,7	ei	10	28	100	5	10	15
0,7	ei	10	40	100	5	10	15
0,7	ei	10	20	200	10	10	20
0,7	ei	10	20	100	10	10	20
0,7	ei	10	20	50	10	10	15
0,7	ei	5	20	50	10	5	26
0,7	kyllä*	5	28	50	10	5	18

Pastellin (2010) käyttämän HPAEC-PAD -menetelmän mukaisesti kokeiltiin lisätä mukaan natriumasetaattia irrottamaan kolonniin mahdollisesti tiukasti kiinnittyneitä hiilihydraatteja. Kaikkien hiilihydraattien havaittiin lopulta eluoituvan kuitenkin myös ilman asetaattia, mutta kunnostusosaan lisätyn natriumasetaatin havaittiin silti vaikuttavan seuraavan injektion resoluutioon. Mahdollisesti natriumasetaatin vaikutuksesta kolonnin stationäärifaasin ammoniumryhmät palautuivat jälleen toimintakykyisiksi, minkä vuoksi natriumasetaatti päätettiin pitää osana kunnostusosaa.

Menetelmän kehityksessä kokeiltiin myös ulkoisella pumpulla tehtävää kolonnin jälkeistä NaOH-lisäystä (300, 200 ja 100 mM NaOH-pitoisuuksilla virtausnopeudella 0,3 ml/min) terävöittämään piikkejä ja parantamaan yhdisteiden resoluutiota (taulukko 4). Kolonnin jälkeisen NaOH-lisäyksen havaittiin tasoittavan pohjaviivaa ja terävöittävän hieman piikkejä. Alun toiminnan jälkeen pumpun kuitenkin havaittiin lisäävän pohjan taustakohinaa. Tätä kohinan lisääntymistä ei havaittu ilman pumppua, joten pumpun käytöstä jouduttiin luopumaan lukuisista korjausyrityksistä huolimatta, ja lopullinen menetelmän optimointi jouduttiin tekemään ilman ulkoista lisäpumppua.

Taulukko 4. Post column -pumpun ja natriumasetaatin kanssa käytetyt ajo-olosuhteet menetelmän kehityksessä. Taulukossa on esitettyä menetelmän eri osioissa käytettyjen ajoliuoksien suhteet prosentteina sekä osuuskien kestot minuiteina. Käytetyt ajoliuokset olivat eri kokeiluissa: (*) Milli-Q-vesi (A), 50 mM NaOH (B) ja 50 mM NaOH + 500 mM NaOAc (C) ja (**) Milli-Q-vesi (A), 50 mM NaOH (B) ja 400 mM NaOH + 200 mM NaOAc (C).

Ajoliuokset	Virtausnopeus (ml/min)	Post column C _{NaOH}	Post column -virtausnopeus (ml/min)	Erottamisosa		Kunnostusosa		Tasapainotusosa	
				A/B (%)	kesto (min)	A/C (%)	kesto (min)	A/B (%)	kesto (min)
*	0,7	-	-	90/10	15	90/10	10	90/10	20
*	0,7	-	-	90/10	27	80/20	10	90/10	19
*	0,7	200	0,3	90/10	22	80/20	10	90/10	19
*	0,7	200	0,3	90/10	27	80/20	10	90/10	19
**	0,7	-	-	90/10	22	50/50	10	90/10	24
**	0,6	-	-	90/10	27	75/25	10	90/10	19
*	0,6	100	0,3	90/10	27	50/50	10	90/10	19

Post column -pumpusta aiheutuneiden ongelmien johdosta jouduttiin menetelmän kehityksessä palaamaan takaisin alkuun. Erottamis- ja tasapainotusosan NaOH-pitoisuutta nostettiin, jotta pohjaviivan nousu saatiin minimoitua. Tasainen pohjaviiva yhdessä riittävän resoluution kanssa saavutettiin 30 mM NaOH-pitoisuudella. Kunnostusosassa olevan natriumasetaatin huomattiin vaikuttavan pieninkin muutoksin seuraavan injektion

resoluutioon, joten kunnostusosan NaOAc-pitoisuus, pituus ja virtausnopeus optimoitiin monen eri olosuhdekokeilun kautta (taulukko 5).

Taulukko 5. Ilman post column -pumppua kokeillut eri ajo-olosuhteet. Taulukossa on esitettyä menetelmän eri osissa käytettyjen ajoliuksien suhteet prosentteina sekä näiden osien kestot minuutteina. Ajoliuksina olivat: Milli-Q-vesi (A), 100 mM NaOH (B) ja 100 mM NaOH (C).

Virtausnopeus (ml/min)	Erottamisosa		Kunnostusosa		Tasapainotusosa	
	A/B	kesto	A/C	kesto	A/B	kesto
	(%)	(min)	(%)	(min)	(%)	(min)
0,6	50/50	27	0/100	6	50/50	18
0,6	70/30	27	40/60	5	70/30	14
0,6	70/30	37	40/60	5	70/30	14
0,6	70/30	37	70/30	5	70/30	19
0,6	70/30	40	70/30	10	70/30	18
0,6	70/30	40	60/40	10	70/30	18
0,6	70/30	40	50/50	10	70/30	18
0,7	70/30	40	70/30	10	70/30	18
0,7	70/30	40	65/35	10	70/30	18
0,7	70/30	35	70/30	6	70/30	17
0,7	70/30	35	70/30	5	70/30	18
0,7	70/30	35	70/30	4	70/30	19
0,7	70/30	35	70/30	3	70/30	20
0,8	70/30	40	70/30	10	70/30	18
0,8	70/30	35	70/30	8	70/30	18
0,8	70/30	35	70/30	6	70/30	17
0,8	70/30	35	70/30	5	70/30	18
0,8	70/30	35	70/30	4	70/30	19
0,8	70/30	35	70/30	3	70/30	20
0,9	70/30	35	70/30	5	70/30	18
0,9	70/30	35	70/30	4	70/30	19
0,9	70/30	35	70/30	3	70/30	20
0,8 (36–40 min ajan 0,7)	70/30	35	70/30	4	70/30	19
0,6 (12–28 min ajan 1,0)	50/50	27	0/100	6	50/50	18

Lopullinen ajo-ohjelma saatiin lopulta optimoitua lukuisten eri olosuhdekokeilujen avulla (taulukko 6). Ensimmäisten näytesarjojen myötä havaittiin kuitenkin pitkissä ajosarjoissa pohjaviivan laskua sarjan loppuosan injektioissa, minkä vuoksi injektioiden väliin lisättiin regenerointivaihe kolonnin tasapainottamiseksi (taulukko 7). Regenerointivaihe ajettiin

aina kahdeksan injektion välein, joista kaksi ensimmäistä injektiota ajettiin tasapainotuksen varmistamiseksi.

Taulukko 6. Menetelmän kehityksessä valittu lopullinen ajo-ohjelma, jossa ajoliuokset olivat: Milli-Q-vesi (A), 100 mM NaOH (B) ja 100 mM NaOH + 500 mM NaOAc (C).

Aika (min)	virtaus (ml/min)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)	Ajoliuos C (%)
0-25	0,8	70	30	0
26-30	0,8	70	0	30
31-55	0,8	70	30	0

Taulukko 7. Kolonnin regeneroimiseksi käytetty välitasapainotusvaihe, jossa ajoliuokset olivat: Milli-Q-vesi (A), 100 mM NaOH (B), 100 mM NaOH + 500 mM NaOAc (C).

Aika (min)	virtaus (ml/min)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)	Ajoliuos C (%)
1-59	0,8	0	100	0
60-100	0,8	70	30	0
101-105	0,8	70	0	30
106-120	0,8	70	30	0

3.2.8 Hiilihydraattiprofiilien määrittäminen ja PCA-mallien luominen

HPAEC-PAD-laitteistosta tuloksina saadut kromatogrammit integroitiin käyttäen Empower-ohjelmistoa (Empower 3, Build No. 3471, Waters, USA). Kromatogrammeista integroitujen hiilihydraattien pitoisuus määritettiin laskemalla piikkien korkeus ja sijoittamalla laskettu korkeus vastaavan hiilihydraatin standardisuorasta määritettyyn suoranyhtälöön. Mitattujen hiilihydraattipitoisuuksien avulla määritettiin näytteille niiden hiilihydraattiprofiilit.

Näytteiden hiilihydraattiprofiileja verrattiin keskenään käyttäen hyväksi PCA:ta LatentiX-ohjelmalla (LatentiX Aps, versio 2.12, Frederiksberg, Tanska). Analyysissä latauksina (engl. loadings) käytettiin näytteistä löytyneitä hiilihydraatteja ja pisteinä (engl. scores) itse näytteitä ja niistä mitattuja hiilihydraattien pitoisuuksia. Esikäsittelynä aineistolle käytettiin autoskaalausta (engl. autoscale). Luotujen PCA-mallien avulla pyrittiin löytämään pääkomponenttiyhdistelmä, jolla eri hunajalajit pysyttiin erottamaan toisistaan niissä esiintyvien hiilihydraattien pitoisuuksien perusteella ilman, että tulosaineistoa selittävä varianssi oli liian pieni. Malleissa PCA:n perusteella pääjoukosta selkeästi eronneet lajihunajat poistettiin mallista poikkeavina havaintoina (engl. outliers) luotaessa uusia malleja, joiden avulla malliin jäljelle jääneiden lajihunajien erot saatiin paremmin selville.

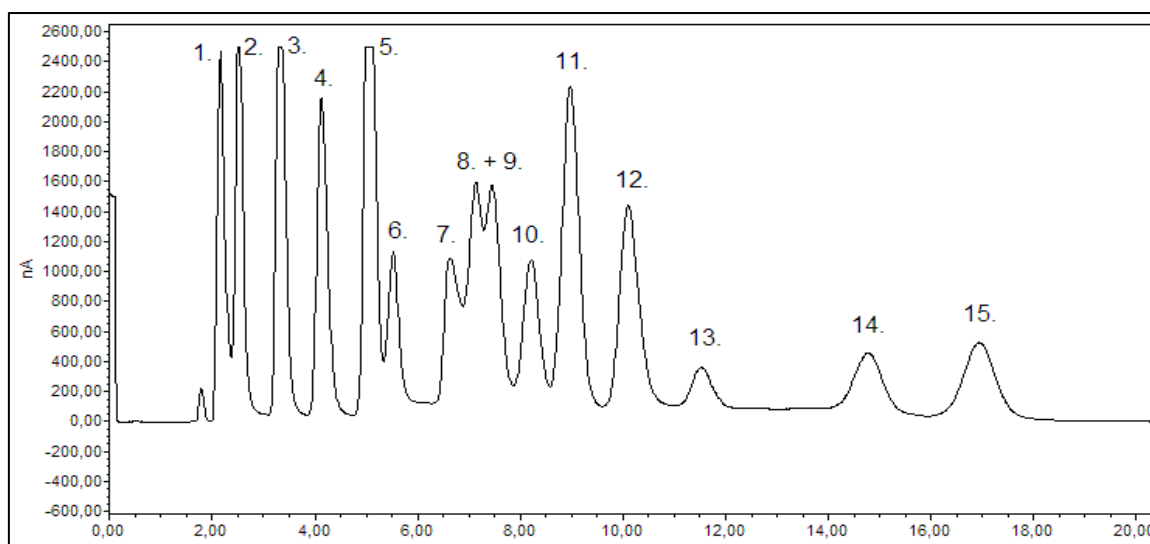
3.3 Tulokset

3.3.1 Hiilihydraattien määrittämiseksi valittu menetelmä

Menetelmän kehityksessä valitulla lopullisella määritysmenetelmällä pystyttiin erottamaan suurin osa käytetyistä hiilihydraattistandardeista. Vain meletsitoosin ja isomaltoosin sekä kojibioosin ja 1-kestoosin erottamiseen ei menetelmällä onnistuttu. Kunnostusosan pituuden optimointi neljän minuutin pituiseksi oli merkittävä menetelmän resoluutioon vaikuttanut tekijä. Valitun virtausnopeuden (0,8 ml/min) avulla yhdisteiden resoluutio pysyi riittävänä eikä yhdisteiden eluutioon kulunut aika toisaalta kasvanut liian suureksi. Lisäksi yksittäisen näytteen injektioon ja analysointiin kuluva aika saatiin menetelmässä pidettyä kohtuullisena optimoimalla kunnostusosan pituus sekä siinä käytetty NaOH-pitoisuus (taulukko 6). Kahdeksan injektion jälkeen tehty kolonnin välitasapainotus kuitenkin pidensi pitkien analyysien kokonaisaika.

3.3.2 Kromatografinen erottuminen ja menetelmän toimivuus

Hiilihydraattien eluotumisjärjestys standardiseoksessa on esitetty kuvassa 9. Kaikki 16 tutkimuksessa käytettyä hiilihydraattistandardia eluoutuivat ennen 18:aa minuuttia. Isomaltoosi ja meletsitoosi sekä kojibioosi ja 1-kestoosi eluoutuivat samanaikaisesti, minkä vuoksi niiden erottaminen toisistaan ei ollut mahdollista. Kromatografiset parametrit laskettiin standardiseoksesta mitattujen vasteiden avulla (taulukko 8). Hiilihydraattien retentiotekijät vaihtelivat 0,21–8,50 ja erotustekijät 1,06–2,10. Pienin laskettu resoluutio (0,63) oli isomaltoosin ja meletsitoosin välillä, kun taas suurin resoluutio (2,60) oli turanoosin ja nigeroosin välillä. Kojibioosin ja 1-kestoosin välinen resoluutio oli 0, sillä yhdisteet eluoutuivat samanaikaisesti.



Kuva 9. Hiilihydraattien eluotumisjärjestys standardiseoksessa. Ensimmäinen kromatogrammissa havaittu piikki kuvasi kuollutta tilavuutta. Tämän jälkeen hiilihydraattien järjestys oli: fusitoli (1), trehaloosi (2), fukoosi (3), ramnoosi (4), glukoosi (5), sakkaroosi (6), fruktoosi (7), isomaltoosi ja meletsitoosi (8 + 9), raffinoosi (10), kojibioosi ja 1-kestoosi (11), gentiobioosi (12), turanoosi (13), nigeroosi (14) ja maltoosi (15).

Taulukko 8. Standardiseoksesta lasketut kromatografiset parametrit: retentioaika (t_R), retentiotekijä (k), resoluutio (R), erotustekijä (α). Resoluutio ja erotustekijä on esitetty arvon kohdalle lasketun yhdisteen ja taulukossa sen alapuolella olevan yhdisteen välillä.

Yhdiste	t_R (min)	k	R	α
Fusitoli	2,154	0,21	0,87	1,94
Trehaloosi	2,502	0,40	1,58	2,10
Fukoosi	3,293	0,85	1,39	1,55
Ramnoosi	4,128	1,32	1,46	1,37
Glukoosi	5,002	1,81	0,87	1,16
Sakkaroosi	5,522	2,10	1,71	1,20
Fruktoosi	6,634	2,72	0,83	1,10
Isomaltoosi	7,134	3,00	0,63	1,06
Meletsitoosi	7,450	3,18	1,17	1,10
Raffinoosi	8,209	3,60	0,85	1,12
Kojibioosi + 1-kestoosi	8,973	4,03	1,07	1,16
β -gentiobioosi	10,099	4,66	1,29	1,17
Turanoosi	11,523	5,46	2,60	1,33
Nigeroosi	14,774	7,29	1,49	1,17
Maltoosi	16,940	8,50	-	-

Taulukossa 9 on esitettyinä hiilihydraattistandardien avulla määritetyt toteamis- ja määrittäysrajat sekä hunajanäytteiden mittauksista saadut yhdisteiden retentioaikojen vaihteluvälit. Glukoosin eluotumisen jälkeen sekä toteamis- että määrittäysrajat suurenivat

selvästi. Fusitolin, trehaloosin, fukoosin, ramnoosin, glukoosin ja raffinoosin retentioajat vaihtelivat hyvin vähän eri mittausten välillä. Fruktoosin, turanoosin, nigeroosin ja maltoosin retentioajoissa taas oli jopa yli kahden minuutin eroja eri mittausten välillä.

Taulukko 9. Hiilihydraattiprofiilin määrittämiseen valittujen yhdisteiden toteamis- ja määrittämissrajat (LOD ja LOQ) standardiseoksesta mitattuina sekä retentioaikojen vaihteluvälit minuutteina kaikissa tutkimuksessa mukana olleissa näytteissä (n=99).

Yhdiste	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Retentioaikojen vaihteluväli (min)
Fusitoli	0,17	0,5	0,05
Trehaloosi	0,17	0,5	0,30
Fukoosi	0,17	0,5	0,30
Ramnoosi	0,17	0,5	0,03
Glukoosi	0,17	0,5	0,42
Fruktoosi	0,67	2	1,88
Raffinoosi	0,33	1	0,04
Turanoosi	1,67	5	1,63
Nigeroosi	0,67	2	2,37
Maltoosi	0,67	2	2,46

Kahtena eri päivänä suoritetuista saantokokeista lasketut tulokset on esitetty taulukossa 10. Neljän käytetyn hiilihydraatin saannot vaihtelivat hyvin paljon. Fusitolin saantoprosentit olivat melko paljon yli tavoitellun 100 %:n, kun taas kolmen muun yhdisteen saannot jäivät alle 50 %:iin.

Taulukko 10. Kahtena eri päivänä määritetyt fusitolin, ramnoosin, turanoosin ja maltoosin saantoprosentit (n=12).

Yhdiste	Saantoprosentti (pv 1)	Saantoprosentti (pv 2)
Fusitoli	134	122
Ramnoosi	42	48
Turanoosi	15	17
Maltoosi	26	19

Kahtena erillisenä päivänä suoritettujen toistettavuuskokeiden tulokset on esitetty taulukossa 11. Laboratorion vertailunäytteestä mitattujen hiilihydraattien pitoisuuksien keskiarvot olivat eri päivinä lähellä toisiaan ja keskihajonnat olivat pienet. Lasketut variaatiokertoimet vaihtelivat 1,1–7,2.

Taulukko 11. Vertailunäytteestä mitatuille kuudelle eri hiilihydraatille suoritettujen toistettavuuskokeiden pitoisuuksien (g/100g) keskiarvot (\bar{x}), keskihajonnat (σ) ja variaatiokertoimet (v) kahdelta eri päivältä (n=12).

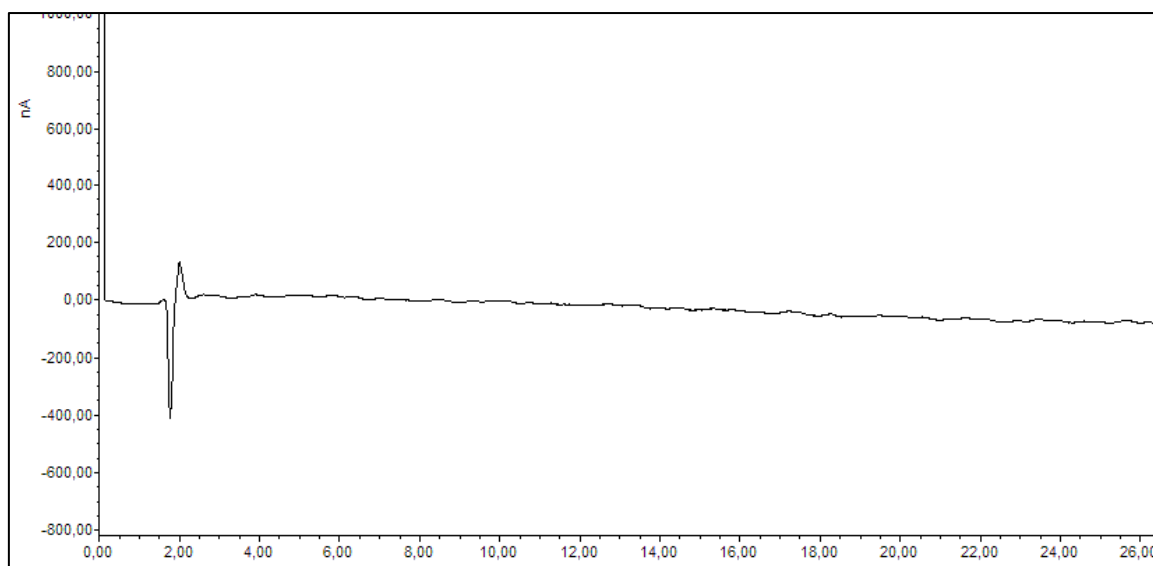
	Fusitoli	Trehaloosi	Fukoosi	Turanoosi	Nigeroosi	Maltoosi
\bar{x} pv 1	0,446	0,069	0,443	0,200	0,127	0,170
σ pv 1	0,008	0,005	0,005	0,009	0,004	0,003
v pv 1	1,8	7,2	1,1	4,5	3,1	1,8
\bar{x} pv 2	0,422	0,058	0,422	0,205	0,126	0,174
σ pv 2	0,014	0,004	0,012	0,014	0,004	0,010
v pv 2	3,3	6,9	2,8	6,8	3,1	5,7

Menetelmän uusittavuus laskettiin kahdeksana eri päivänä injektoidun vertailunäytteen hiilihydraattien laskettujen pitoisuuksien avulla (taulukko 12). Trehaloosin variaatiokerroin oli selvästi muiden määritettyjen hiilihydraattien variaatiokertoimia suurempi. Myös turanoosin variaatiokerroin oli hieman suurempi kuin suositeltu variaatiokertoimen arvo (10).

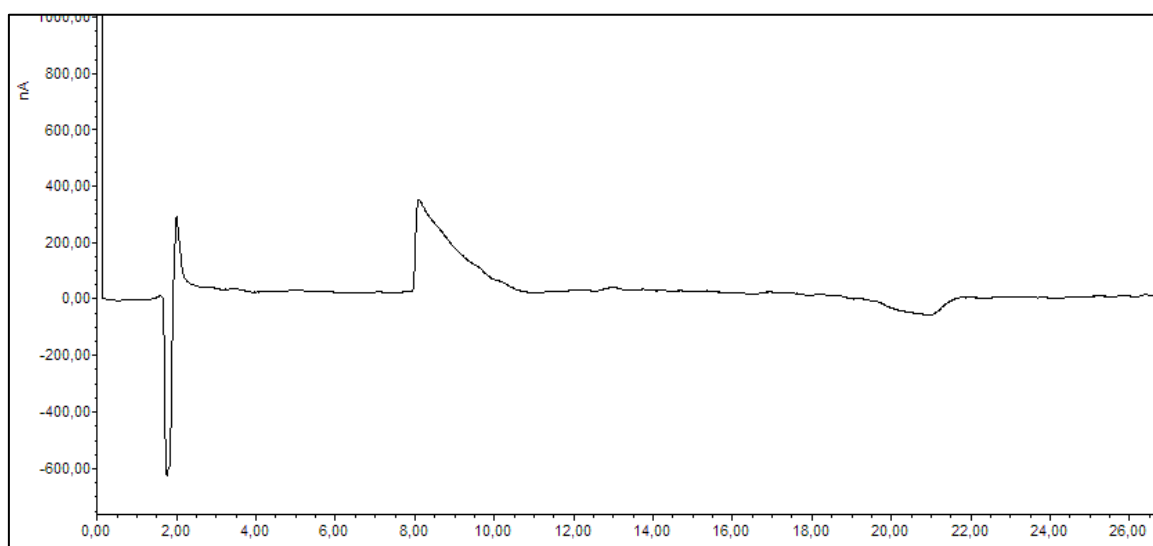
Taulukko 12. Vertailunäytteestä mitatuille kuudelle eri hiilihydraatille suoritettujen uusittavuuskokeiden pitoisuuksien (g/100g) keskiarvot (\bar{x}), keskihajonnat (σ) ja variaatiokertoimet (v) (n=8).

	Fusitoli	Trehaloosi	Fukoosi	Turanoosi	Nigeroosi	Maltoosi
\bar{x}	0,38	0,03	0,26	1,92	1,14	1,91
σ	0,03	0,01	0,02	0,24	0,08	0,17
v	7,43	23,28	5,92	12,70	7,36	8,84

Menetelmän spesifisyys määritettiin injektoimalla menetelmässä käytettyjä ajoliuoksia kolonniin. Ajoliuos-B:n (100 mM NaOH) injektio ei aiheuttanut vastetta detektorilla (kuva 10). Ajoliuos-C:n (100 mM NaOH + 500 mM NaOAc) injektio sen sijaan aiheutti vasteen noin 8 minuutin kohdalla (kuva 11).



Kuva 10. B-ajoliuoksen (100 mM NaOH) injektiosta saatu kromatogrammi.



Kuva 11. C-ajoliuoksen (100 mM NaOH + 500 mM NaOAc) injektiosta saatu kromatogrammi.

Hiilihydraattistandardeille määritetyt standardisuorien suoranyhtälöt sekä korrelaatiokertoimet on esitetty taulukossa 13. Korrelaatiokertoimet vaihtelivat 0,9705–0,9996. Turanoosin ja fruktoosin korrelaatiokertoimet olivat hieman muiden hiilihydraattien kertoimia pienempiä.

Taulukko 13. Näytteissä erottuneille hiilihydraateille lasketut standardisuorien yhtälöt sekä suorien korrelaatiokerroimet.

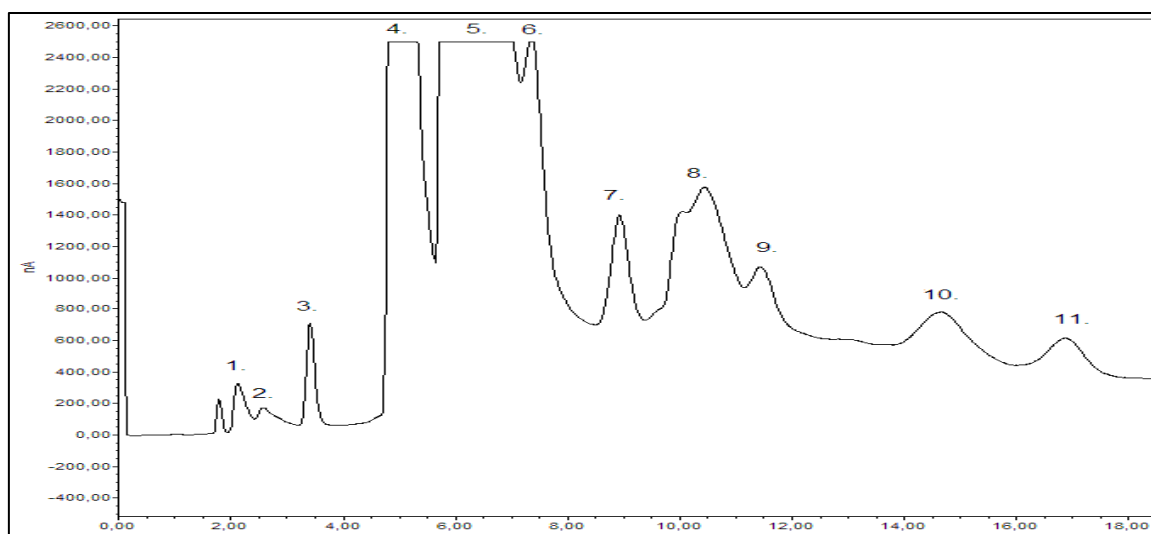
Yhdiste	Standardisuoranyhtälö	Korrelaatiokerroin (R^2)
Fusitoli	$y = 44769x - 6797,8$	0,9935
Trehaloosi	$y = 53504x + 17690$	0,9961
Fukoosi	$y = 62372x + 17332$	0,9978
Ramnoosi	$y = 39987x + 2346,4$	0,9951
Glukoosi	$y = 55852x + 11339$	0,9996
Fruktoosi	$y = 10467x + 17521$	0,9705
Raffinoosi	$y = 16656x + 6943,6$	0,9941
Turanoosi	$y = 3823,6x + 2246,5$	0,9754
Nigeroosi	$y = 6235,5x + 2658,9$	0,9958
Maltoosi	$y = 8014,5x + 626,47$	0,9923

3.3.3 Näytteissä esiintyneet hiilihydraatit

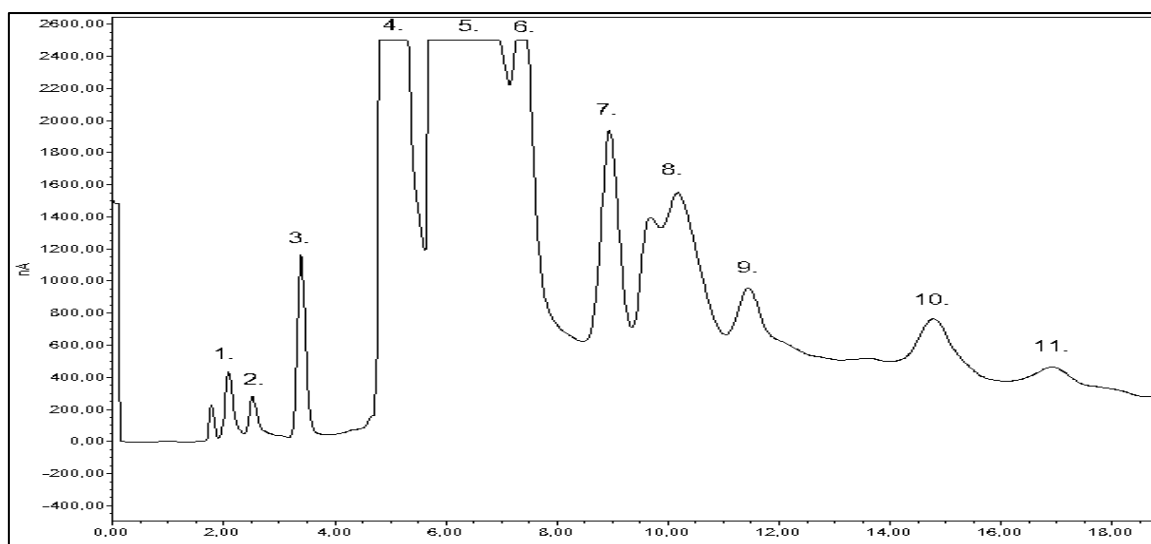
Kaikista tutkituista näytteistä löydettiin määritysrajan ylittävänä pitoisuuksina fusitolia, fukoosia, glukoosia, fruktoosia, turanoosia ja nigeroosia. Maltoosipitoisuus ylitti määritysrajan kaikissa muissa näytteissä paitsi yhdessä puolukka- ja yhdessä sekahunajanäytteessä. Trehaloosipitoisuus ylitti määritysrajan noin puolessa näytteistä. Ramnoosia löydettiin määritysrajan ylittävänä pitoisuuksina kolmesta mesikastenäytteestä ja raffinoosia yhdestä mesikastehunajanäytteestä.

Osassa näytteistä fusitolin ja trehaloosin resoluutio ei ollut täydellinen, mikä saattoi vaikuttaa näiden yhdisteiden kvantifointiin kyseisissä näytteissä. Turanoosin resoluutio β -gentiobioosin ja sen kanssa samanaikaisesti eluoituneen tuntemattoman yhdisteen muodostamasta yhteispiikistä oli heikkoa tai melko heikkoa noin puolessa näytteistä, mikä vaikeutti turanoosin kvantifointia ja saattoi vaikuttaa näytteistä määritettyihin turanoosipitoisuuksiin. Muutamasta näytteestä mitattu fruktoosipitoisuus oli poikkeuksellisen suuri, sillä näytteiden mittauksissa fruktoosin retentioaika oli keskimääräistä pienempi, mikä kromatogrammeissa näkyi korkeampina fruktoosipiikkeinä.

Kuvassa 12 on esitettyä voikukkahunajan 1:5-laimennoksesta saatu kromatogrammi. Kuvasta voidaan havaita, että β -gentiobioosin kanssa eluoitui samanaikaisesti tuntematon yhdiste, joka teki β -gentiobioosin kvantifioimisesta hyvin vaikeaa. Ongelma esiintyi lähes jokaisessa analysoidussa näytteessä, minkä vuoksi β -gentiobioosi jouduttiin jättämään pois lopullisesta tulosten tarkastelusta. Kojibioosin ja 1-kestoosin muodostama yhteinen piikki (kuvassa piikki nro 7) sekä isomaltoosin ja meletsitoosin yhteispiikki (kuvassa piikki nro 6) havaittiin suurimmassa osassa näytteitä. Nämä neljä hiilihydraattia jouduttiin myös jättämään huonon resoluution vuoksi pois tulosten jatkokäsittelystä. Lisäksi glukoosin ja fruktoosin välissä eluoitunut sakkaroosi jouduttiin jättämään pois jatkotarkastelusta, sillä 1:5-laimennoksissa se peittyi suurten glukoosi- ja fruktoosipiikkien alle ja 1:200-laimennoksissa näytteiden sakkaroosin pitoisuus ei ylittänyt toteamisrajaa. Kuvasta käy ilmi myös turanoosin heikko erottuminen, mikä aiheutti osassa näytteitä ongelmia tämän hiilihydraatin integroinnissa. Kuvassa 13 on esitettyä lehmushunajan 1:5-laimennoksen kromatogrammi, jossa on esimerkki turanoosin huomattavasti paremmasta resoluutiosta.

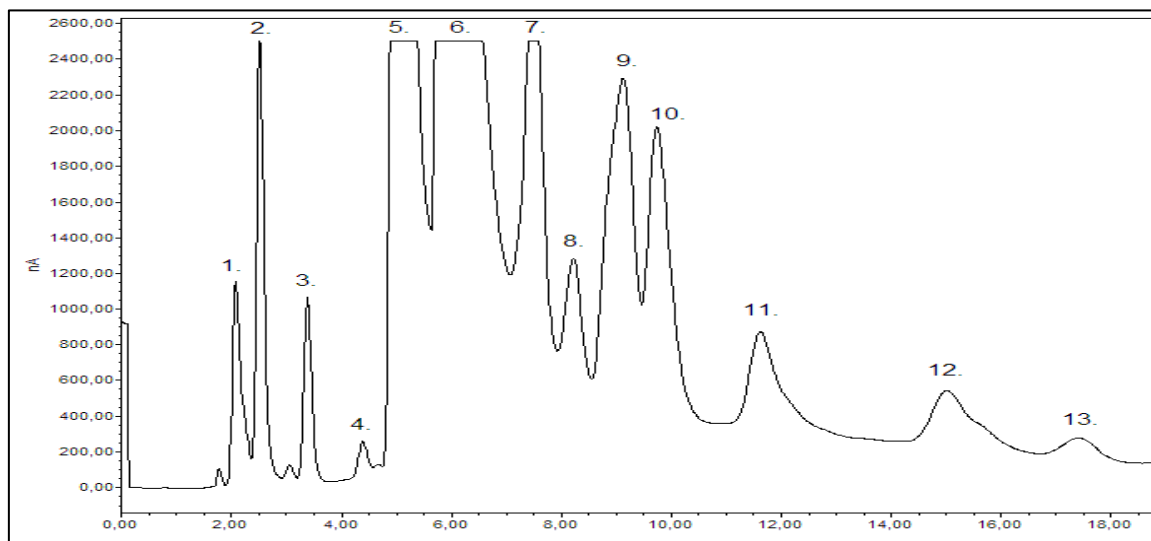


Kuva 12. Voikukkahunajan 1:5-laimennoksen kromatogrammi: fusitoli (1), trehaloosi (2), fukoosi (3), glukoosi (4), fruktoosi (5), isomaltoosi ja meletsitoosi (6), kojibioosi ja 1-kestoosi (7), β -gentiobioosi ja tuntematon yhdiste (8), turanoosi (9), nigeroosi (10) ja maltoosi (11).



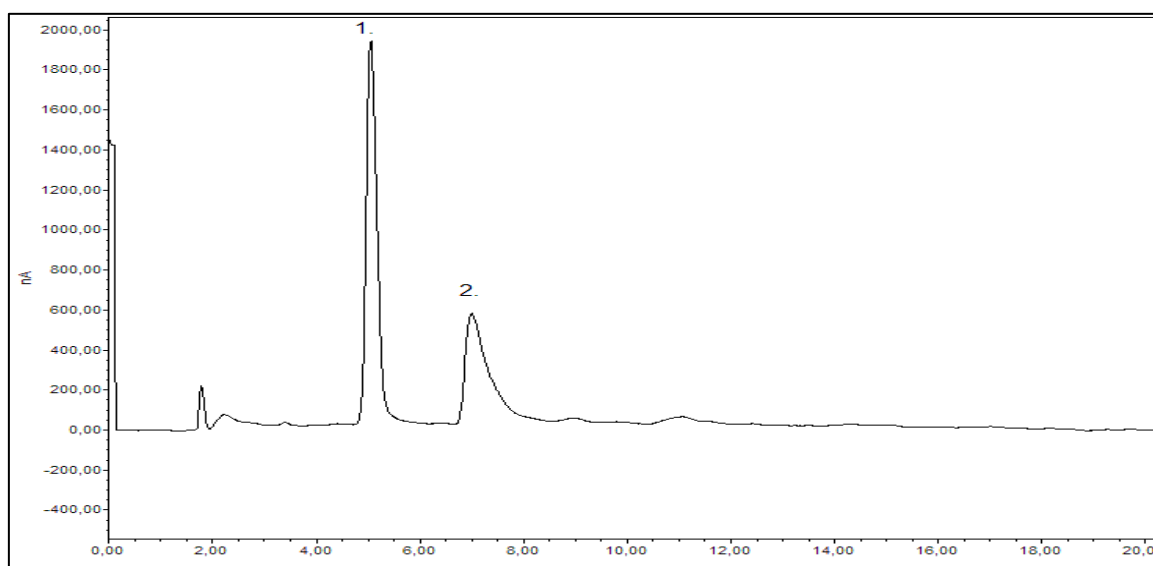
Kuva 13. Lehmushunajan 1:5-laimennoksen kromatogrammi: fusitoli (1), trehaloosi (2), fukoosi (3), glukoosi (4), fruktoosi (5), isomaltoosi ja meletsitoosi (6), kojibioosi ja 1-kestoosi (7), β -gentiobioosi ja tuntematon yhdiste (8), turanoosi (9), nigeroosi (10) ja maltoosi (11).

Kuvassa 14 on esitettyä mesikastehunajan 1:5-laimennoksesta saatu kromatogrammi. Kuvasta voidaan nähdä mesikastenäytteille tyypillinen trehaloosin suuri vaste. Myös kuvassa näkyvät ramnoosin ja raffinoosin aiheuttamat vasteet havaittiin vain mesikastenäytteissä.



Kuva 14. Mesikastehunajan 1:5-laimennoksen kromatogrammi: fusitoli (1), trehaloosi (2), fukoosi (3), ramnoosi (4), glukoosi (5), fruktoosi (6), isomaltoosi ja meletsitoosi (7), raffinoosi (8), kojibioosi ja 1-kestoosi (9), β -gentiobioosi (10), turanoosi (11), nigeroosi (12) ja maltoosi (13).

Kuvassa 15 on esitettyä voikukkahunajan 1:200-laimennoksesta saatu kromatogrammi, josta voidaan nähdä glukoosin ja fruktoosin aiheuttamat vasteet. Eri lajihunajien 1:200-laimennoksissa ei glukoosi- ja fruktoosipitoisuuksia lukuun ottamatta ollut suuria eroja, sillä muiden hiilihydraattien pitoisuudet näytteissä eivät ylittäneet määrittämissä tällä laimennoksessa.



Kuva 15. Voikukkahunajan 1:200-laimennoksen kromatogrammi: glukoosi (1), fruktoosi (2).

Rinnakkaisille näytteille suoritetun Dixonin Q-testin perusteella hylättiin yhteensä 11 eri rinnakkaisnäytteen mittaustulosta. Viisi näistä rinnakkaismittauksista oli glukoosin, viisi turanoosin ja yksi maltoosin määrittämisessä havaittuja rinnakkaismittauksia. Näytteissä, joissa Q-testillä havaittiin olevan poikkeava mittaustulos, jätettiin poikkeava arvo pois tulosten jatkokäsittelystä ja näiden hiilihydraattien pitoisuudet kyseisissä näytteissä laskettiin kahden jäljelle jääneen rinnakkaisnäytteen avulla.

Rinnakkaisten näytteiden mittauksista laskettujen variaatiokertoimien vaihteluvälit ja keskiarvot eri hiilihydraateille on esitetty taulukossa 14. Trehaloosin, fruktoosin, turanoosin, nigeroosin ja maltoosin variaatiokertoimissa vaihteluvälit olivat suuret verrattuna ennen fruktoosia eluoituneisiin hiilihydraatteihin. Variaatiokertoimien keskiarvot olivat kuitenkin kaikilla hiilihydraateilla alle 10.

Taulukko 14. Kaikkien tutkittujen näytteiden rinnakkaismittausten avulla määritettyjen variaatiokertoimien vaihteluvälit ja keskiarvot eri hiilihydraateille.

Hiilihydraatti	Vaihteluväli	Keskiarvo
Fusitoli	0,5–4,9	2,1
Trehaloosi	0,4–18,2	7,7
Fukoosi	0,1–2,5	1,1
Ramnoosi	1,2–7,1	3,7
Glukoosi	0,4–4,2	1,5
Fruktoosi	0,8–10,7	5,6
Raffinoosi	1,5*	1,5
Turanoosi	1,3–13,1	6,0
Nigeroosi	0,7–13,0	4,4
Maltoosi	1,6–14,5	8,1

*) Raffinoosia oli vain yhdessä mesikastenäytteessä.

Näytteistä löytyneiden hiilihydraattien pitoisuuksien vaihteluvälit eri lajihunajissa on esitetty taulukossa 15. Etenkin fruktoosipitoisuuksissa eri lajihunajien vaihteluvälit olivat hyvin suuria. Myös glukoosipitoisuudet ja osittain maltoosipitoisuudet vaihtelivat samaa lajia olleiden näytteiden kesken melko paljon. Niistä lajihunajista, joista tutkittavana oli vain yksi näyte, on taulukossa esitetty vain rinnakkaismittauksista laskettu pitoisuuden keskiarvo. Glukoosi ja fruktoosi olivat selvästi pitoisuuksiltaan suurimmat hiilihydraatit näytteissä. Turanoosin pitoisuus oli kaikissa näytteissä selvästi suurin verrattuna muihin pienemmissä pitoisuuksissa esiintyneisiin hiilihydraatteihin. Maltoosi- ja nigeroosipitoisuudet ylittivät 1 g/100 g pitoisuuden, joissakin näytteissä. Myös mesikaste-hunajista mitattu trehaloosi pitoisuus ylitti kyseisen pitoisuuden osassa näytteitä.

Taulukko 15. Eri hunajalajien hiilihydraattipitoisuuksien (g/100 g) vaihteluvälit näytteissä. Apila-, jättipalsami-, valkomesikkä- ja horsmahunajanäytteille on esitetty vain rinnakkaismittausten keskiarvo: samaa lajia olleiden näytteiden lukumäärä (n), fusitoli (Fus), trehaloosi (Tre), fukoosi (Fuk), ramnoosi (Ram), glukoosi (Glc), fruktoosi (Fru), raffinoosi (Raf), turanoosi (Tur), nigeroosi (Nig), maltoosi (Mal), hiilihydraatin pitoisuus ei ylittänyt määritysrajaa (ND).

Sekakukka	Horsma	Valko- mesikkä	Jätti- palsami	Apila	Hilla	Lehmus	Puolukka	Voikukka	Kanerva	Mesikaste	Tattari	Laji
4	1	1	1	1	2	2	3	3	5	5	5	n
0,19-0,69	0,23	0,24	0,28	0,59	0,717-0,724	0,22-0,23	0,26-0,58	0,19-0,60	0,19-0,37	0,21-0,59	0,15-0,24	Fus
ND-0,03	ND	0,06	0,15	ND	0,029-0,033	ND-0,09	ND-0,10	ND-0,05	ND-0,04	0,03-1,21	ND-0,05	Tre
0,22-0,27	0,28	0,26	0,28	0,30	0,27-0,35	0,40-0,42	0,21-0,55	0,24-0,38	0,17-0,35	0,18-0,51	0,16-0,42	Fuk
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND-0,10	ND	Ram
34,6-38,4	31,9	39,7	33,4	36,0	29,2-30,1	31,8-31,9	32,1-34,2	35,5-40,4	28,2-34,8	24,5-32,7	32,8-39,7	Glc
46,7-70,6	44,2	52,7	47,7	51,5	43,3-49,1	44,8-51,4	45,9-54,2	44,5-52,7	42,9-59,6	46,6-61,6	47,2-56,2	Fru
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND-0,85	ND	Raf
1,49-2,13	2,86	1,63	1,67	2,21	1,83-2,27	2,23-2,34	1,19-2,36	2,08-2,65	1,33-2,27	1,04-3,35	1,38-2,06	Tur
0,44-0,86	1,73	0,67	0,79	0,78	0,71-0,86	1,07-1,22	0,67-1,05	0,78-1,10	0,60-0,80	0,46-1,39	0,47-0,92	Nig
ND-1,46	1,28	0,19	1,13	0,44	0,17-0,28	0,26-0,37	ND-0,91	0,13-0,63	0,23-1,06	0,19-1,20	0,19-1,63	Mal

3.3.4 Lajihunajien hiilihydraattiprofiileille tyypilliset piirteet

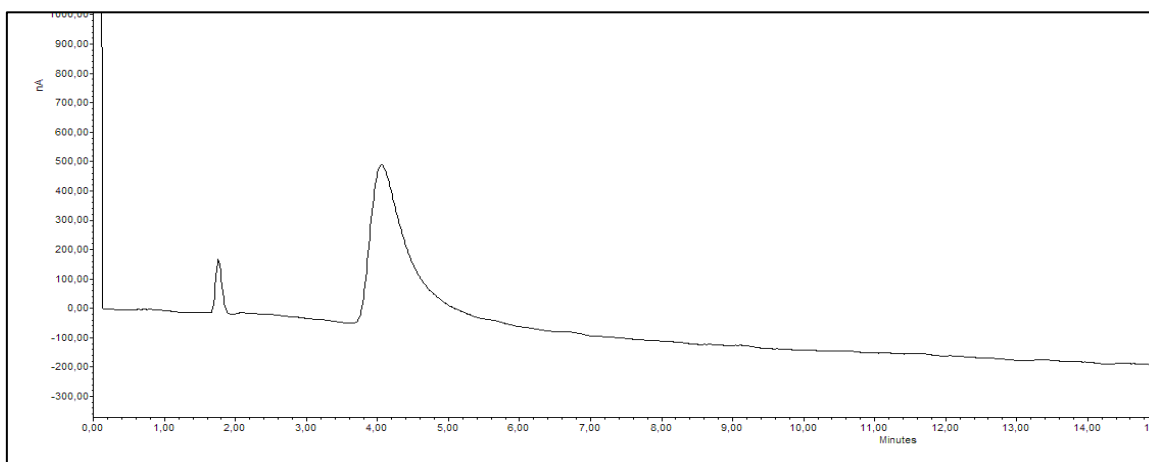
Osalle lajihunajista voitiin löytää niiden hiilihydraattiprofiilille tyypillisiä ominaisuuksia joko joidenkin hiilihydraattien esiintyvyyden tai hiilihydraattien välisten suhteiden avulla. Nämä ominaisuudet ovat esitettyinä taulukossa 16. Esimerkiksi mesikastehunajanäytteissä ramnoosin esiintyvyys sekä yhdessä näytteessä raffinoosin esiintyvyys olivat selviä vain mesikastehunajalle tyypillisiä piirteitä. Lisäksi nigeroosin ja maltoosin sekä fukoosin ja fusitolin välisissä suhteissa havaittiin olevan osassa lajihunajia niiden hiilihydraattiprofiileille tyypillisiä ominaisuuksia. Tattari-, kanerva-, puolukka- ja sekakukkahunajanäytteistä ei löytynyt selkeitä näiden hunajien hiilihydraattiprofiilia määrittäviä piirteitä.

Taulukko 16. Lajihunajille hiilihydraattien esiintyvyyden tai hiilihydraattien välisten suhteiden avulla löydettyjä tyypillisiä ominaisuuksia: hiilihydraatin pitoisuus ylitti määritysrajan lajihunajanäytteissä (+), hiilihydraatin pitoisuus ei ylittänyt määritysrajaa lajihunajanäytteissä (ND) ja hiilihydraattien välisellä suhteella ei pystytty karakterisoimaan lajihunajaa (-).

Hunajalaji	Ramnoosin esiintyvyys	Raffinoosin esiintyvyys	Nigeroosi-maltoosi - suhde	Fukoosi-fusitoli - suhde	Nigeroosi + maltoosi/fusitoli +fukoosi
Mesikaste	+	+	> 1	-	-
Voikukka	ND	ND	> 1	-	-
Valkomesikkä	ND	ND	> 1	-	-
Jättipalsami	ND	ND	< 1	-	-
Lehmus	ND	ND	> 1	< 1	-
Hilla	ND	ND	> 1	< 1	-
Apila	ND	ND	> 1	< 1	-
Horsma	ND	ND	-	-	> 1
Tattari	ND	ND	-	-	-
Kanerva	ND	ND	-	-	-
Puolukka	ND	ND	-	-	-
Sekakukka	ND	ND	-	-	-

3.3.5 HMF-määritys menetelmän avulla

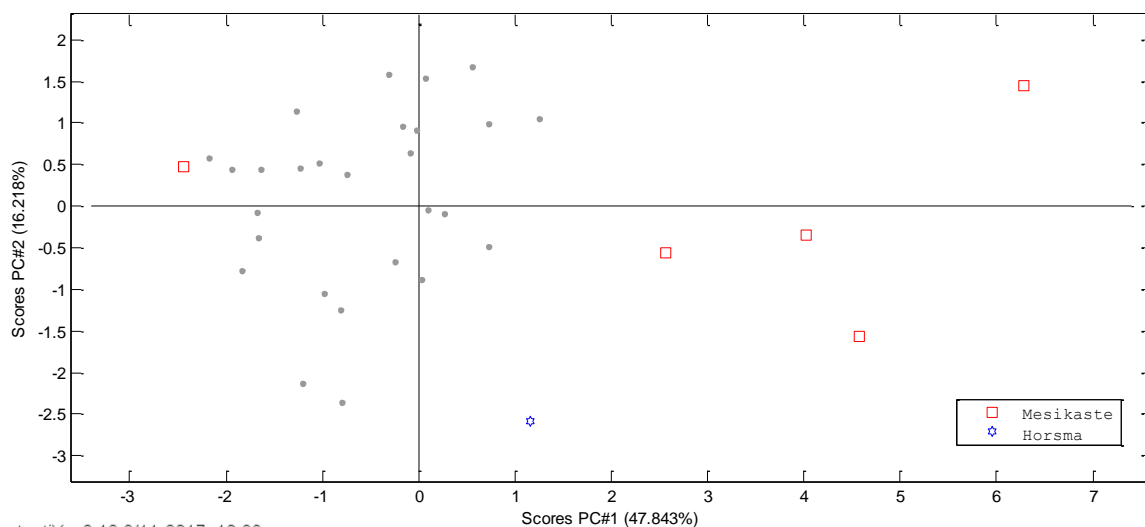
HMF-standardin injektion havaittiin käytetyllä menetelmällä aiheuttavan selkeän vasteen kromatogrammissa noin neljän minuutin kohdalla (kuva 16). HMF:n retentioaika oli lähes identtinen ramnoosin kanssa. Menetelmän avulla oli siis mahdollista havaita, mikäli hunajanäytteissä on lämmittämisen tai pitkäaikaisen varastoinnin myötä muodostunut hydroksimetyylifurfuraalia.



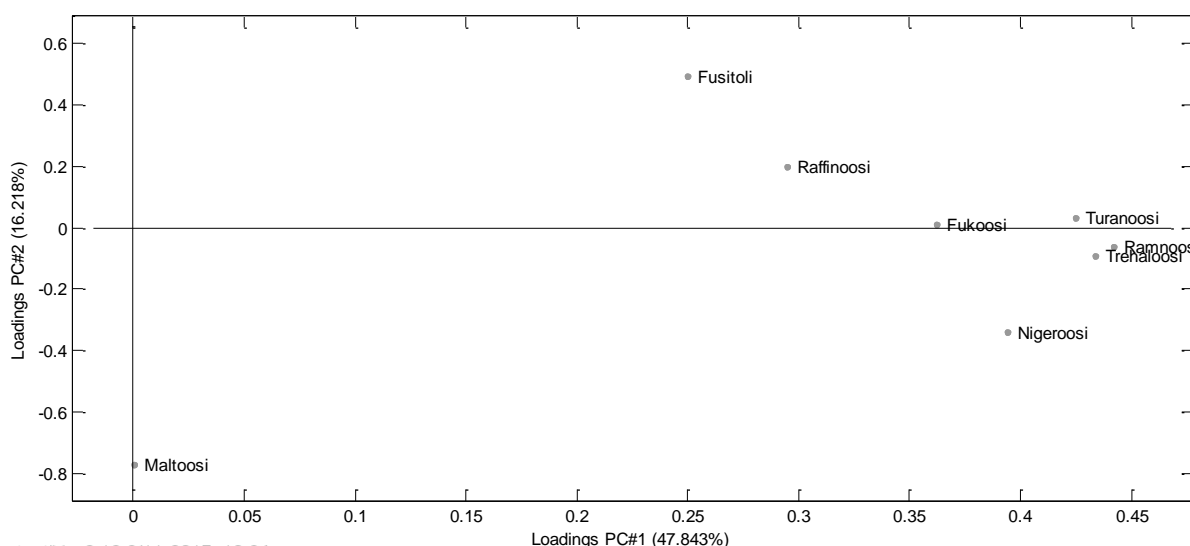
Kuva 16. HMF-injektion (0,01 µg/ml) aiheuttama vaste kromatogrammissa.

3.3.6 PCA:n avulla tapahtuva lajihunajien erottaminen toisistaan

PCA-mallien luomisessa pyrittiin käyttämään mahdollisimman kattavasti hiilihydraatti-profiilien määrittämisessä saatua tulosaineistoa. Malleja selittäviä tekijöitä rajattiin pois, mikäli jonkin tekijän ei havaittu tuovan eroa lajihunajien välille. Myös mallissa jo selkeästi eronneet näytteet poistettiin jatkomalleista, jotta tämän jälkeen jäljelle jääneiden näytteiden erot saatiin paremmin esille. Ensimmäisessä luodussa PCA-mallissa kaikki tutkimuksessa mukana olleet yksittäiset näytteet toimivat analyysin pisteinä (kuva 17), kun taas hiilihydraatit fusitoli, trehaloosi, fukoosi, ramnoosi, raffinoosi, turanoosi, nigeroosi ja maltoosi toimivat mallissa pisteiden sijoittumisen määräävinä latauksina (kuva 18). Luotu PCA-malli selitti n. 64 % koko aineiston varianssista. Mallin avulla voitiin havaita, että mesikastennäytteet erosivat yhtä näytettä lukuun ottamatta selvästi kaikista kukkaishunajanäytteistä. Myös horsmahunaja näytti mallissa hieman eroavan muista kukkaishunajista.



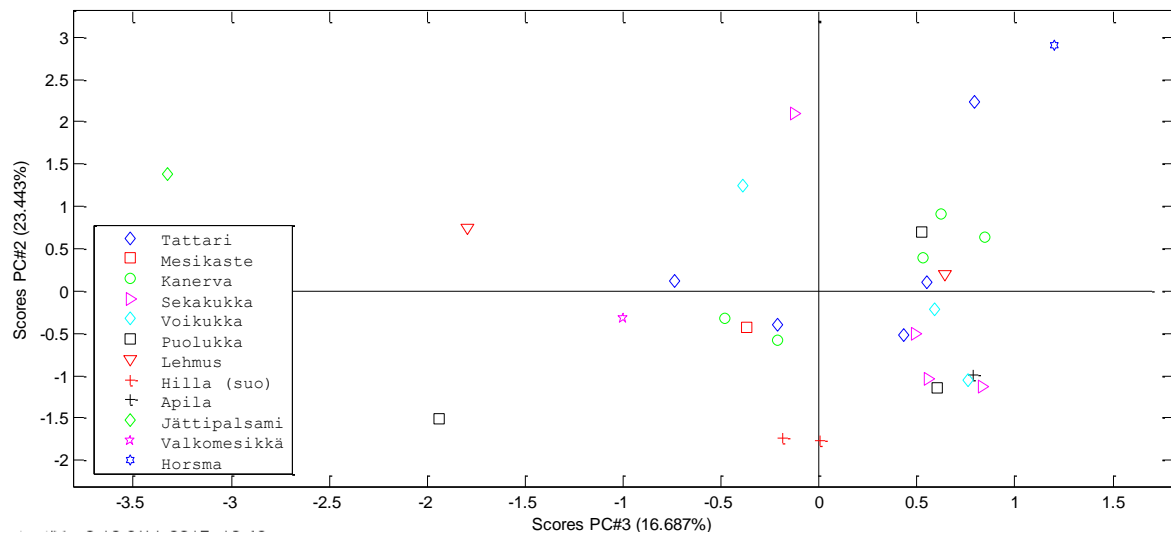
Kuva 17. Näytteiden sijoittuminen ensimmäisessä PCA-mallissa. Mallissa ovat korostettuina eroa tuoneet mesikaste- (□) ja horsmanäytteet (☆). Muita kukkaishunajia (●) ei ole kuvaajassa eritelty lajeittain.



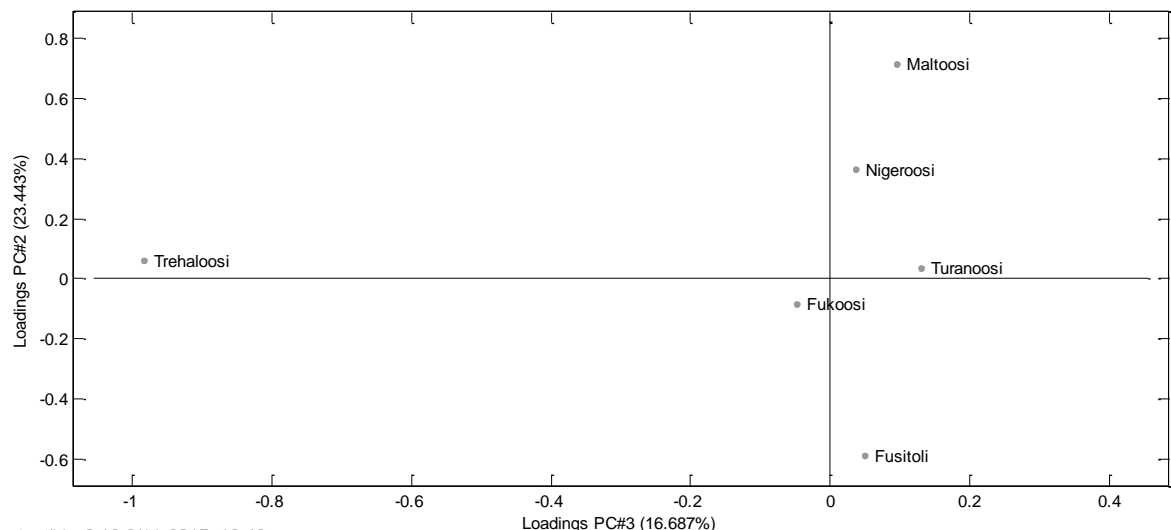
Kuva 18. Ensimmäisessä PCA-mallissa käytetyt lataukset ja niiden sijoittuminen.

Kun mallista poistettiin selkeästi eronneet neljä mesikastehunajanäytettä, pystyttiin luomaan uusi malli, jonka avulla kukkaishunajanäytteiden väliset erot tulivat selvemmin esille (kuva 19). Malliin vaikuttavat lataukset ja niiden sijoittuminen muuttuivat verrattuna ensimmäiseen malliin (kuva 20). Mesikastenäytteiden myötä mallin latauksista poistuivat ramnoosi ja raffinoosi, joita ei esiintynyt malliin jääneissä hunajanäytteissä. Mallin avulla voitiin selittää n. 40 % koko aineiston varianssista. Jättipalsami-, horsma- ja hillanäytteet näyttivät selkeimmin eroavan mallissa havaitusta pääjoukosta. Myös valkomesikkänäyte sijoittui hieman tämän pääjoukon ulkopuolelle. Lehmusnäytteistä toinen näyte osoitti

selkeitä eroja pääjoukkoon nähden, mutta toinen lehmusnäytteistä jäi joukon keskelle. Sekakukka-, voikukka-, kanerva- ja tattarinäytteet muodostivat melko yhtenevän pääjoukon origon ympärille. Osana samaa joukkoa oli myös mukana ollut yksittäinen apilanäyte. Puolukkanäytteet eivät osoittaneet yhtenevääsyyttä vaan näytteet hajaantuivat ympäri mallia.



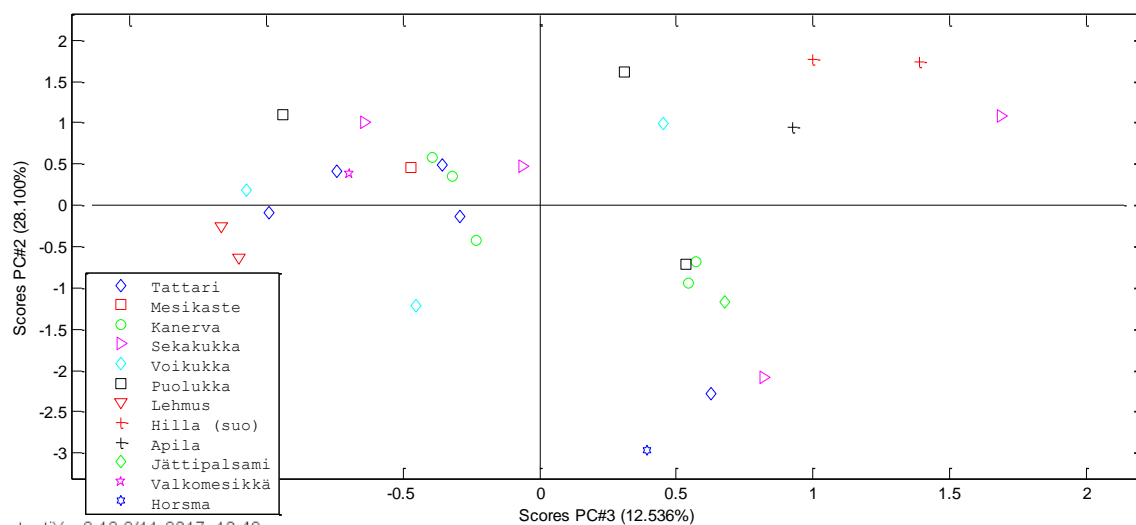
Kuva 19. Toisessa PCA-mallissa mukana olleiden näytteiden sijoittuminen käytettyjen latausten perusteella.



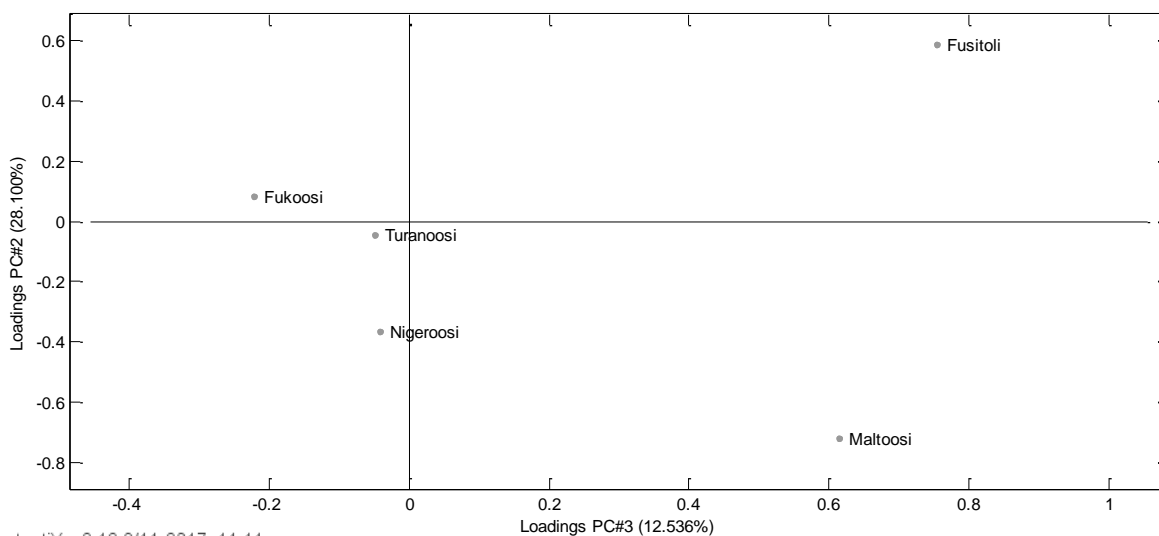
Kuva 20. Toisen PCA-mallin, josta on poistettu ensimmäisessä mallissa eronneet mesikastehunajanäytteet, lataukset.

Toisessa luodussa PCA-mallissa trehaloosilla oli hyvin vahva vaikutus näytteiden sijoittumiseen. Poistamalla trehaloosi mallin latauksista saatiin luotua vielä kolmas PCA-

malli, jonka avulla pyrittiin selvittämään malliin jäljelle jääneiden hiilihydraattien pitoisuuksien vaikutus näytteiden erottumiseen. Mallin avulla ei saatu aikaan enää merkittäviä eroja näytteiden välille (kuva 21), vaikka trehaloosin poistaminen muutti malliin vaikuttavien latausten sijoittumista (kuva 22). Kaksi lehmusnäytettä sijoittuivat tässä mallissa hyvin lähelle toisiaan, mutta ne eivät kuitenkaan eronneet merkittävästi muista näytteistä. Lisäksi yksittäinen apilanäyte näytti eroavan hieman enemmän tässä mallissa. Myös kolmas PCA-malli selitti n. 40 % koko aineiston varianssista.



Kuva 21. Kolmannessa PCA-mallissa mukana olleiden näytteiden sijoittuminen mallin latausten perusteella.



Kuva 22. Kolmannen PCA-mallin latausten sijoittuminen.

3.4 Pohdinta

3.4.1 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksen yhteydessä ilmeni useita ongelmia, joiden vuoksi tutkimuksen menetelmän kehitysvaihe venyi suunniteltua pidemmäksi. Yksi suurimmista ongelmista oli ajosarjojen satunnainen katkeaminen Empower-ohjelmistoon liittyneen ohjelmistovirheen vuoksi. Ongelman korjaamiseksi asennettiin laitteistoon Watersin E-Satin-yksikkö (Waters, USA), mutta yksikön asennus ei kuitenkaan auttanut ongelmaan. Sen sijaan yksikön asennuksen ja irrottamisen yhteydessä laitteiston suorituskyky muuttui siten, että aiemmin 1:5-laimennoksessa melko tasainen pohjaviiva nousi selvästi fruktoosin eluoitumisen jälkeen. Tämän lisäksi laitteiston herkkyys analysoitaville yhdisteille kuitenkin parani samalla. Ajosarjojen satunnainen katkeaminen saatiin lopulta korjattua liittämällä laitteisto vanhempaan Empower-versioon. Standardiseoksesta mitattujen vasteiden perusteella ohjelmistoversion vaihdon ei huomattu vaikuttavan menetelmän toimintaan.

Resoluution parantamiseksi ja piikkien terävöittämiseksi yritettiin myös käyttää ulkoisen pumpun avulla tehtävää kolonnin jälkeistä natriumhydroksidilisäystä. Pumppu kuitenkin aiheutti kromatogrammissa merkittävää taustakohinan lisääntymistä, minkä vuoksi kolonnin jälkeistä NaOH-lisäystä ei pystytty ottamaan mukaan lopulliseen menetelmään. Kolonnin jälkeinen NaOH-lisäys olisi mahdollisesti voinut tasoittaa pohjaviivan jyrkkiä nousuja ja laskuja, mikä olisi mahdollisesti voinut näkyä joidenkin yhdisteiden kuten fusitolin, trehaloosin sekä turanoosin parantuneena resoluutiona sekä menetelmän parantuneena selektiivisyytenä.

Menetelmään yritettiin myös tuoda mukaan sisäistä standardia, mikä olisi tarkentanut näytteiden hiilihydraattien pitoisuuden määrittämistä. Sisäisenä standardina yritettiin käyttää yhdisteitä, joita ei aiempien tutkimusten perusteella ollut löydetty hunajasta (arabinoosia, sorbitolia sekä ksyloosia). Ongelmaksi muodostui kuitenkin, että nämä yhdisteet eluoutuivat joko samanaikaisesti muiden näytteistä löytyneiden hiilihydraattien kanssa tai glukoosin ja fruktoosin välissä, jolloin kokeillut standardit hukkuivat näiden pitoisuudeltaan suurien hiilihydraattien piikkien alle näytteiden 1:5-laimennoksissa.

Eri vahvuisten NaOH-pitoisuuksien havaittiin menetelmän kehityksessä vaikuttavan hiilihydraattistandardien eluutiojärjestykseen. Esimerkiksi kehityksen alkuvaiheessa

erottamisosassa käytetyllä 5 mM NaOH-liuoksella sakkaroosin, fruktoosin, meletsitoosin ja isomaltoosin eluutiojärjestys poikkesi lopullisen menetelmän ajo-ohjelmalla havaitusta järjestyksestä. Tämän perusteella ajoliuoksen NaOH-pitoisuuden lisäoptimoinnilla voitaisiin mahdollisesti vielä parantaa standardiyhdisteiden resoluutiota, sillä ajoliuoksen pH:n avulla voidaan vaikuttaa siihen, mitkä hiilihydraattien hydroksyyliiryhmät ionisoituvat ja mitkä eivät (Folkes ja Jordan 2006). Hydroksyyliiryhmien ionisoitumiseen vaikuttamalla voitaisiin siis mahdollisesti vaikuttaa myös yhdisteiden eluutiojärjestykseen ja resoluutioon, jolloin menetelmän avulla pystyttäisiin määrittämään nykyistä useampia hiilihydraatteja.

Standardiyhdisteiden retentiojärjestys menetelmässä oli mielenkiintoinen. Perinteisesti yhdisteet eluoituvat nestekromatografisissa menetelmissä molekyylikoon mukaisessa järjestyksessä, mikäli yhdisteiden muissa vuorovaikutuksissa kolonnin kanssa ei ole suuria eroja (Folkes ja Jordan 2006). Menetelmän eluutiojärjestys ei kuitenkaan seurannut lainkaan yhdisteiden molekyylikoon mukaista järjestystä. Ensimmäisenä menetelmässä eluoituivat sokerialkoholit fusitoli ja sorbitoli, jota yritettiin menetelmän kehitysvaiheessa käyttää sisäisenä standardina. Sokerialkoholien pelkistyneen hydroksyyliiryhmän havaittiin siis vähentävän näiden yhdisteiden vuorovaikutusta CarboPac PA1 -kolonnin kanssa verrattuna tutkimuksessa mukana olleisiin hiilihydraatteihin. Tämä saattoi johtua mm. polyolien rakenteelle tyypillisestä suoraketjuisuudesta (Mäkinen 1994). Fusitolin jälkeen menetelmässä eluoitui disakkaridi trehaloosi, jota seurasivat kolme monosakkaridia fukoosi, ramnoosi ja glukoosi. Myös neljä viimeisenä eluoitunutta hiilihydraattia olivat disakkarideja, mikä tarkoitti, että tutkimuksessa mukana olleet kolme trisakkaridistandardia omasivat selvästi näitä disakkarideja heikommat vuorovaikutukset käytetyn kolonnin kanssa. Merkittävää oli myös se, että menetelmässä käytännössä samanaikaisesti eluoituivat disakkaridi isomaltoosi ja trisakkaridi meletsitoosi. Vastaava di-trisakkaridipari oli havaittavissa kojibioosin ja 1-kestoosin eluution yhteydessä. Hiilihydraattien eluoitumista käytettäessä CarboPac PA1 -kolonnia on siis hyvin vaikea ennustaa pelkästään yhdisteen koon perusteella, koska esimerkiksi yhdisteiden hydroksyyliiryhmien sijoittumisella sekä ionisoitumisella näyttäisi olevan huomattavasti molekyylikokoa suurempi vaikutus niiden vuorovaikutuksiin kolonnin kanssa (Folkes ja Jordan 2006).

3.4.2 Menetelmän toimivuus

Retentiotekijä k :n suositeltu vaihteluväli on 1-10 (CHROMacademy 2017). Alle yhden jäävien retentiotekijän arvojen ongelmana pidetään, että tällöin eluoituvat yhdisteet voivat eluoitua yhdessä muiden alussa eluoituvien analyttien tai käytetyn liuottimen kanssa. Standardiseoksessa fusitoli, trehaloosi ja fukoosi jäivät tämän suositellun k :n arvovälin alapuolelle. Näiden jälkeen eluoituneiden yhdisteiden k :n arvot sen sijaan sijoittuivat hyvin suositellulle välille.

Muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta yhdisteiden resoluutiot olivat hyviä. Laskettujen resoluutioiden ja erotustekijöiden perusteella myös menetelmän selektiivisyyden voidaan sanoa olleen pääasiassa hyvä. Analyttien välisen resoluution voidaan sanoa olevan täydellinen, kun resoluutio on suurempi kuin 1,5 (CHROMacademy 2017). Menetelmän avulla standardiseoksesta lasketut resoluutiot vaihtelivat 0,63–2,60, joten eri yhdisteiden välisissä resoluutioissa voidaan sanoa olleen suurta vaihtelua. Isomaltoosi ja meletsitoosi sekä kojibioosi ja 1-kestoosi eluoituivat käytännössä samanaikaisesti, mikä teki näiden yhdisteiden välisistä resoluutioista erittäin heikkoja. Fusitolin ja trehaloosin välinen hieman heikompi resoluutio (0,87) näkyi osassa näytteitä näiden yhdisteiden välisenä hieman heikompana erottumisena, mikä vaikutti myös näiden yhdisteiden kvantifointiin. Glukoosin ja sakkaroosin välinen resoluutio ei ollut standardiseoksessa hyvä. Toisaalta sakkaroosin määrittäminen näytteiden 1:5-laimennoksista ei ollut mahdollista eivätkä näytteiden sakkaroosipitoisuudet ylittäneet toteamisrajaa 1:200-laimennoksissa, joten näytteissä yhdisteiden välisellä heikolla resoluutiolla ei voida sanoa olleen merkitystä. Samasta syystä fruktoosin sekä isomaltoosin ja meletsitoosin välisellä heikolla resoluutiolla ei ollut käytännön merkitystä näytteissä. Vaikka standardiseoksen perusteella β -gentiobioosin ja turanoosin välinen resoluutio oli melko hyvä, oli näiden yhdisteiden erottumisessa ongelmia osassa näytteitä. Tämä saattoi johtua β -gentiobioosin yhteydessä eluoituneesta tuntemattomasta yhdisteestä, joka mahdollisesti heikensi resoluutiota.

Erotustekijän avulla voidaan resoluution lisäksi arvioida menetelmän selektiivisyyttä. Erotustekijän ylittäessä arvon 1,2 voidaan puhua kahden yhdisteen välisestä hyvästä erottuvuudesta ja menetelmän hyvästä selektiivisyydestä (CHROMacademy 2017). Täydellisen resoluution arvo 1,5 saavutetaan jo erotustekijän ollessa noin 1,15. Heikoimmat erotustekijät olivat isomaltoosin ja meletsitoosin (1,06), fruktoosin ja isomaltoosin (1,10) sekä meletsitoosin ja raffiinoosin (1,10) välillä. Hunajan suuresta fruktoosipitoisuudesta johtuen isomaltoosi ja meletsitoosi jäivät mittauksissa

fruktoosiin alle jolloin yhdisteiden välisellä erotustekijällä ei ollut käytännössä merkitystä. Raffinoosia löydettiin myös vain yhdestä mesikastenäytteestä jolloin meletsitoosin ja raffinoosin välinen erotustekijä ei ollut tutkimuksen kannalta kovin merkittävä. Muiden yhdisteiden osalta erotustekijät olivat pääasiassa yli suositellun arvon (1,15).

Suoritettujen saantokokeiden tulokset eivät olleet aivan toivottuja. Fusitolin saantokokeissa tulokset olivat selvästi yli tavoitellun 100 %:n, kun taas ramnoosin, turanoosin ja maltoosin saantoprosentit olivat alle 50 %:n. Myös menetelmän oikeellisuutta jouduttiin arvioimaan saantokokeiden perusteella, koska varmennettua vertailumateriaalia tai yleisesti hyväksyttyä referenssimenetelmää ei ollut käytettävissä. Tulosten perusteella menetelmän oikeellisuudessa voidaan sanoa olleen parantamisen varaa.

Menetelmän toistettavuus oli tyydyttävä. Vain maltoosin kohdalla eri päivien välisissä variaatiokertoimissa oli selkeää eroa. Variaatiokertoimet olivat kuitenkin kaikkien hiilihydraattien osalta alle 10:n, mitä voidaan pitää hyväksyttävyyden rajana. Myös uusittavuus oli trehaloosia ja turanoosia lukuun ottamatta hyvä. Trehaloosin suuri variaatiokerroin uusittavuuskokeissa selittyi hiilihydraatin pienellä pitoisuudella vertailunäytteessä, jolloin pienikin hajonta mittauksissa vaikutti merkittävästi variaatiokertoimeen. Turanoosin hieman suurempi variaatiokerroin selittyi turanoosin erottumiseen liittyneillä ongelmilla, jotka vaikeuttivat turanoosin kvantifiointia kromatogrammista.

Menetelmän toteamis- ja määrittämisrajat olivat melko pienet. Verrattuna esimerkiksi HPLC-RI-menetelmällä mitattuihin hunajan hiilihydraattipitoisuuksiin (Salonen 2011) pystyttiin tässä työssä kehitetyn menetelmän avulla hunajanäytteistä määrittämään huomattavasti pienempiä hiilihydraattipitoisuuksia. Standardisuorien korrelaatiokertoimet olivat myös pääsääntöisesti hyviä. Vain fruktoosin ja turanoosin korrelaatiokertoimet olivat hieman muita pienempiä. Tämä myös osaltaan vaikutti näytteistä mitattuihin fruktoosi- ja turanoosipitoisuuksiin. Menetelmän spesifisyys tutkituille hiilihydraateille oli suoritettujen kokeiden perusteella hyvä. B-ajoliuoksen injektioista ei havaittu aiheutuvan lainkaan häiriötä kromatogrammiin. C-ajoliuoksen injektioista havaittiin aiheutuvan vaste kromatogrammiin noin 8 minuutin kohdalla, mutta kyseinen ajoliuos tuli kuitenkin menetelmässä mukaan vasta analyttien eluoitumisen jälkeen 26 minuutin kohdalla, jolloin ajoliuoksista ei voida sanoa aiheutuneen häiriötä hiilihydraattien määrittämiseen.

Yhdisteiden retentioaikojen pysyvyys vaihteli eri hiilihydraateilla huomattavasti. Fusitolin, trehaloosin, fukoosin, ramnoosin ja glukoosin retentioajat vaihtelivat vain vähän verrattuna niiden jälkeen eluoituneisiin yhdisteisiin. Etenkin fruktoosin retentioaika vaihteli näytteiden välillä merkittävästi, jolloin pieni retentioaika näkyi osassa näytteitä suurina fruktoosihiikkeenä ja näin poikkeuksellisen suurina fruktoosipitoisuuksina.

Glukoosin ja fruktoosin suuret pitoisuudet 1:5-laimennoksissa aiheuttivat pohjaviivan nousun näiden yhdisteiden eluution jälkeen, mikä aiheutti ongelmia fruktoosin jälkeen eluoituneiden yhdisteiden integrointiin kromatogrammeista. Turanoosin integrointia vaikeutti myös osassa näytteitä sen heikko resoluutio edeltävistä yhdisteistä, mikä saattoi aiheuttaa vaihtelua näytteistä määritettyihin turanoosipitoisuuksiin. Glukoosi- ja fruktoosihiikkien jälkeinen voimakas pohjaviivan nousu olisi mahdollisesti voitu välttää injektioimalla näytteitä laimeammassa pitoisuudessa. Tällöin yhdisteiden resoluution ja herkkyuden havaittiin kuitenkin heikkenevän merkittävästi, mikä olisi myös vaikeuttanut yhdisteiden tunnistamista ja kvantifioimista. Glukoosin ja sitä ennen eluoituneiden hiilihydraattien kohdalla retentioaikojen vaihtelun vaikutusta yhdisteiden mitattuun pitoisuuteen näytteissä voidaan pitää melko pienenä. Fruktoosin ja sen jälkeen eluoituneiden hiilihydraattien osalta retentioaikojen vaihtelu sekä resoluutiossa ilmenneet ongelmat saattoivat vaikuttaa näiden yhdisteiden näytteistä mitattuihin pitoisuuksiin.

3.4.3 Varastoinnin ja hunajan satovuoden vaikutus näytteissä

Tutkimuksessa käytetyt näytteet oli tuotettu vuosien 2012 ja 2016 välisenä aikana. Tämä tarkoitti, että vanhimpien ja tuoreimpien näytteiden ikäero oli jopa 4 vuotta. Koska hunajan hiilihydraatit ovat säilytyksen aikana alttiita mm. entsymaattiselle hydrolyysille ja muille muutoksille (Rybak-Chmielewska 2007; Da Silva ym. 2016), voivat eripituiset säilytysajat vaikuttaa näytteiden hiilihydraattiprofiiliin. Lisäksi vanhimpien näytteiden säilytysoloista ei ollut tarkasti dokumentoitua tietoa, minkä vuoksi varastoinnin aiheuttamia muutoksia niiden hiilihydraattiprofiileissa on hyvin vaikea arvioida. Näytteistä määritettyjen hiilihydraattiprofiilien perusteella ei kuitenkaan pystytty löytämään eroja, jotka olisivat johtuneet hunajanäytteiden välisistä ikäeroista. Tarkempien säilytyksestä ja ikäeroista johtuvien erojen selvittäminen hiilihydraattiprofiilissa vaatisi suuremman määrän näytteitä sekä tarkemmat tiedot näytteiden säilytysolosuhteista, jotta nyt mahdollisesti löytyneet erot voitaisiin rajata normaalin hajonnan ulkopuolelle.

Näytteistä ei pystytty löytämään merkkejä merkittävistä HMF-pitoisuuksista. Ramnoosin kanssa samanaikaisesti eluoitunut HMF olisi voitu näytteissä havaita poikkeuksellisen suurina ramnoosipitoisuuksina. Ramnoosia löydettiin kuitenkin vain mesikastehunajinäytteistä, joissa kyseisen hiilihydraatin pitoisuudet jäivät pieniksi. Menetelmän toimivuus HMF:n määrittämiseksi tosin määritettiin vain käyttämällä yhtä HMF-pitoisuutta (0,01 µg/ml), joten menetelmän soveltuvuudesta tätä pienempien HMF-pitoisuuksien määrittämiseksi ei ole täyttä varmuutta.

3.4.4 Lajihunajien hiilihydraattiprofiileille tyypillisiä piirteitä

Selkeimmät yksittäistä lajihunajaa määrittävät piirteet löydettiin mesikastehunajista, joista mitattujen raffinoosin ja ramnoosin esiintyvyys erotti ne selvästi muista tutkituista lajihunajista. Näiden hiilihydraattien löytyminen tuntemattomasta näytteestä voisi ilman tarkempia tutkimuksia viitata suoraan näytteen mesikastealkuperään. Lisäksi näytteistä mitattujen eri hiilihydraattien suhteiden avulla voitiin joillekin lajihunajille löytää niiden hiilihydraattiprofiileille tyypillisiä piirteitä. Erityisesti nigeroosi-maltoosisuhteen sekä fukoosi-fusitolisuhteen avulla voitiin mesikaste-, voikukka-, valkomesikkä-, lehmus-, jättipalsami-, hilla-, apila- ja horsmahunajista löytää näille lajihunajille ominaisia piirteitä. Tattari-, kanerva-, puolukka- ja sekahunajanäytteiden hiilihydraattiprofiileista ei kuitenkaan ollut löydettävissä selkeitä näille lajihunajille tyypillisiä piirteitä. Merkittävää oli myös se, että kyseisten lajihunajien näytteiden lukumäärä oli tutkimuksen kokonaisnäytelukumäärän verrattaessa suuri. Ne lajihunajat, joiden hiilihydraattiprofiileista tyypillisiä piirteitä pystyttiin löytämään, olivat mesikastehunajaa lukuun ottamatta näytteiden lukumäärältä pieniä, mikä saattaa selittää, miksi näiden lajihunajien hiilihydraattiprofiileista pystyttiin löytämään karakterisoivia piirteitä. Tämän vuoksi suurempi määrä näytteitä toisi lisää varmuutta siihen, olivatko löydetty erityispiirteet vain satunnaista vaihtelua vai todellisia lajihunajille tyypillisiä piirteitä. Näiden piirteiden avulla ei myöskään voida tehdä liian pitkälle vietyjä johtopäätöksiä hunajan alkuperästä, vaan niiden avulla voidaan korkeintaan tehdä karkea ensiarvio näytteen botaanisesta alkuperästä.

3.4.5 PCA-malleissa havaitut erot lajihunajien välillä

PCA-mallien luomisessa latauksina käytetyt hiilihydraatit valittiin sen perusteella, kuinka paljon hiilihydraatit toivat esiin lajihunajien välisiä eroja mallissa. Esimerkiksi glukoosi ja fruktoosi eivät päätyneet lopullisiin malleihin mukaan, sillä niiden avulla ei pystytty luomaan malleihin lisäeroja. Eri lajihunajien väliset erot päinvastoin tasoittuivat glukoosin ja fruktoosin ollessa mukana malleissa. Lisäksi malleihin yritettiin tuoda mukaan eri hiilihydraattien välisiä suhteita selittävinä tekijöinä, mutta myöskään niiden ei huomattu tuovan mainittavia lisäeroja lajihunajien välille. Valitettavan suuri osa standardiseoksessa mukana olleista hiilihydraateista jouduttiin myös jättämään pois lopullisista hiilihydraattiprofiileista johtuen mm. yhdisteiden heikosta resoluutiosta, mikä vähensi merkittävästi hiilihydraattiprofiilien luomiseen käytettävissä ollutta tulosaainestoa.

Ensimmäisessä luodussa PCA-mallissa neljä viidestä tutkitusta mesikastehunajanäytteestä erosi selvästi tutkimuksessa mukana olleista kukkaishunajanäytteistä. Etenkin mesikastenäytteiden suuret trehaloosi- ja ramnoosipitoisuudet aiheuttivat eroa kukkaishunajiin nähden. Kaikkein selvin ero havaittiin raffinoosia sisältäneen mesikastenäytteen osalta, joka erosi selkeästi kukkaishunajien lisäksi myös muista mesikastenäytteistä. Näytteen hiilihydraattiprofiili oli kuitenkin muuten hyvin lähellä muiden eronneiden mesikastenäytteiden profiileja, sillä raffinoosin vaikutuksen poistaminen mallista aiheutti näytteen sijoittumisen hyvin lähelle muita eronneita mesikastenäytteitä. Neljän selkeästi eronneen mesikastenäytteen lisäksi tutkimuksessa mukana ollut viides mesikastehunajanäyte (näyte E) sen sijaan sijoittui mallissa selvästi lähemmäs kukkaishunaja- kuin mesikastenäytteitä. Mesikastenäytteiden lisäksi horsmahunajanäyte osoitti jo tässä PCA-mallissa eroavansa muista kukkaishunajista suuren maltoosipitoisuuden vuoksi. Mallin selitysaste oli melko hyvä, sillä mallin avulla pystyttiin selittämään n. 64 % koko aineiston varianssista.

Toisessa PCA-mallissa poistettiin ensimmäisessä mallissa neljä selvästi erottunutta mesikastehunajanäytettä, jotta jäljelle jääneiden kukkaishunajanäytteiden väliset erot saatiin paremmin selville. Mallissa oli huomattava, että ”poikkeavina näytteinä” poistettujen mesikastenäytteiden mukana näytteiden sijoittumista määrittävistä latauksista poistuivat sekä ramnoosi että raffinoosi, joita ei enää löytynyt malliin jäljelle jääneistä näytteistä, mikä vähensi mallia selittävän hiilihydraattiprofiilin monipuolisuutta. Luodun mallin perusteella etenkin jättipalsami-, horsma- ja hillahunajat näyttivät eroavan muista lajihunajista. Jättipalsamihunajasta mitattu muita hunajanäytteitä suurempi trehaloosipitoisuus oli selkein eroa tuova tekijä. Horsmanäytteessä eroa aiheutti edelleen näytteen

suuri maltoosipitoisuus, kun taas molemmissa hillanäytteissä suuri fusitolipitoisuus aiheutti eroa näiden näytteiden sijoittumisessa. Myös valkomesikkä- ja lehmusnäytteet näyttivät osittain eroavan hunajien pääjoukosta, mutta näiden lajien kohdalla erot eivät olleet yhtä selviä. Valkomesikkänäytteen hieman suurempi trehaloosipitoisuus aiheutti näytteen sijoittumisen hieman pääjoukon ulkopuolelle, mutta ero ei kuitenkaan ollut yhtä selkeä kuin jättipalsaminäytteellä. Lehmusnäytteistä toinen erosi selkeästi pääjoukosta sen suuren trehaloosipitoisuuden vuoksi, mutta toisaalta toinen tutkimuksessa mukana ollut lehmusnäyte ei eronnut lainkaan pääjoukosta.

Sekakukka-, tattari-, kanerva-, voikukka- ja apilahunajat muodostivat mallissa origon ympärille pääjoukon, josta oli vaikea löytää eroja siinä olleiden eri lajihunajien välillä. Sekakukkahunajista kolme näytettä muodosti mallissa melko yhtenäisen joukon, mutta yhden sekahunajanäytteen suuremmat nigeroosi- ja maltoosipitoisuudet erottivat sen tästä joukosta. Tattarinäytteet muodostivat melko selkeän yhtenäisen joukon. Myös kanerva näytteet muodostivat kaksi hieman erillistä joukkoa, jotka molemmat olivat selkeästi osana pääjoukkoa. Kaksi voikukkanäytettä muodosti pääjoukon keskellä melko yhtenäisen parin, josta kolmas voikukkanäyte erosi hieman. Puolukkanäytteet eivät muodostaneet selkeää yhtenäistä joukkoa vaan näytteiden hiilihydraattiprofiilit erosivat keskenään hyvinkin paljon, mikä näkyi näytteiden suurena hajontana ympäri mallia. Toiseen malliin mukaan jätetty mesikastenäyte sijoittui myös uudessa mallissa osaksi pääjoukkoa, mikä viittaisi näytteen kukkaishunajaa muistuttavaan hiilihydraattiprofiiliin. Luodun mallin selitysaste (n. 40 %) putosi myös hieman ensimmäisestä mallista, sillä lajihunajien välisten erojen esiin saamiseksi jouduttiin lisäämään käytettyjen pääkomponenttien määrää, mikä näkyi mallin pienentyneenä selitysasteena.

Toisessa luodussa PCA-mallissa näytteiden trehaloosipitoisuudet vaikuttivat voimakkaasti niiden sijoittumiseen mallissa. Tämän takia luotiin toisen mallin pohjalta vielä kolmas PCA-malli, jossa trehaloosi poistettiin näytteiden sijoittumiseen vaikuttavista latauksista. Näin saatiin selvitettyä näytteiden sijoittuminen mallissa ilman trehaloosin vaikutusta. Trehaloosin poistaminen mallista aiheutti näytteiden laajemman hajonnan ympäri mallia, mikä vähensi eri lajihunajien välisiä eroja. Toisessa mallissa selkeästi eronnut jättipalsaminäyte lähentyi kolmannessa mallissa huomattavasti muita lajihunajia. Myös hilla- ja horsmahunajien erot tasoittuivat hieman kolmannessa mallissa. Toisaalta apilahunaja erosi uudessa mallissa huomattavasti selkeämmin ja näytteen sijoittuminen mallissa muistutti hyvin paljon hillahunajanäytteitä. Toisessa mallissa selkeästi toisistaan eronneet lehmusnäytteet sijoittuivat kolmannessa mallissa huomattavan lähekkäin, mutta

sijoittumisen avulla ei voitu havaita selkeitä eroja muihin lajihunajiin. Myös kolmannen mallin avulla pystyttiin selittämään noin 40 % koko tulosaineiston varianssista. Mallissa selittäviä latauksia oli kuitenkin enää vain viisi kappaletta, mikä lisäsi näytteiden hajontaa ympäri mallia ja näkyi pienempinä eroina eri lajihunajien välillä. Tämän vuoksi kolmannelle PCA-mallista saatuja tuloksia ei voitu enää pitää tutkimuksen kannalta kovin merkittävänä.

3.4.6 Lajihunajien väliset erot ja näytteiden alkuperän arviointi

Kun verrataan PCA-malleista saatuja tuloksia Suomen Mehiläishoitajain Liiton näytteille aiemmin suorittamista siitepölyanalyysistä ja aistinvaraisista arvioinneista saatuihin tuloksiin, voidaan paremmin arvioida näytteiden todellista botaanista alkuperää ja lajihunajien välisiä eroja. Selkeimmät erot PCA:n avulla saatiin luotua mesikaste- ja kukkaishunajien välille. Vaikka ensimmäisen PCA-mallin perusteella mesikastenäytteiden hiilihydraattiprofiilit eivät olleet täysin yhteneviä, olivat mesikastenäytteiden erot kukkaishunajanäytteisiin verrattuina niin selkeitä, että näiden kahden eri hunajamuodon erottamista toisistaan voidaan pitää kehitetyn menetelmän avulla täysin mahdollisena. Toisaalta jokaisessa PCA-mallissa kukkaishunajien keskelle sijoittunut mesikastenäyte herätti epäilyksiä näytteen todellisesta alkuperästä. Näytteen hiilihydraattiprofiili erosi selvästi muista mesikastenäytteistä eikä kyseisestä näytteestä löytynyt esimerkiksi lainkaan muista mesikastenäytteistä löydettyä ramnoosia. Myös näytteelle suoritettut ulkopuoliset siitepölyanalyysit ja aistinvaraiset arvioinnit antoivat viitteitä mesikastehunajalle poikkeavista ominaisuuksista eikä näytteestä pystytty niissä löytämään mesikastehunajalle tyypillisiä merkkejä. Kyseinen näyte oli ainoa tutkimuksessa mukana ollut näyte, jonka todellinen botaaninen alkuperä herätti epäilyksiä.

Toisessa PCA-mallissa jättipalsami-, hilla-, horsma- ja osittain myös valkomesikkähunaja näyttivät eroavan hiilihydraattiprofiilien perusteella muista lajihunajista. Myös lehmushunaja näytti osittain eroavan muista lajihunajista, mutta toisaalta kahden tutkitun lehmushunajanäytteen hiilihydraattiprofiilit erosivat myös selvästi toisistaan. Jättipalsami-hunaja oli aistinvaraisen arvioinnin sekä siitepölyanalyysin perusteella sekoitus ristikukkaisten, palsamien ja horsman mettä, joten näytettä voidaan tämän perusteella ainakin osittain pitää aitona jättipalsamihunajana. Myös horsmahunajanäytteelle tehdyt esitutkimukset viittasivat näytteen olevan pääosin horsman medestä valmistettua. Horsma- ja jättipalsamihunajanäytteet erosivat PCA:ssa myös selvästi toisistaan, mitä voidaan pitää

tutkimuksessa kehitetyn menetelmän etuna, kun huomioidaan näytteiden siitepölyprofiileissa havaitut yhtäläisyydet. Molemmat hillahunajat olivat pienestä hillan siitepölymäärästä huolimatta aistinvaraisen arvioinnin perusteella melko varmasti hillahunajia tai vähintään muista suoalueen kasveista kerätystä medestä valmistettuja hunajia. Tämä yhdistettynä molempien näytteiden lähekkäiseen sijoittumiseen PCA:ssa näyttäisi puoltavan menetelmän soveltuvuutta hillahunajan erottamiseen muista lajihunajista. Valkomesikkähunajanäyte sen sijaan ei täysin täyttänyt sille asetettuja kriteerejä esitutkimuksissa. Tämä saattaa selittää, miksi valkomesikkänäyte erosi PCA:ssa vain hieman muista lajihunajista. Lehmusnäytteistä vain toiselle oli tehty esitutkimukset, joten näytteiden välistä eroa PCA:ssa ei pystytty selittämään esitutkimuksissa mahdollisesti havaittujen erojen avulla.

Tattari-, kanerva-, voikukka- ja sekakukkahunajat muodostivat yhdessä melko yhtenäisen pääjoukon, josta oli hyvin vaikea löytää eroja näiden lajihunajien hiilihydraattiprofiilien välillä. Myös apilahunaja voitiin laskea osaksi tätä pääjoukkoa, vaikka apilahunaja näytti hieman eroavankin tästä joukosta kolmannen PCA-mallin mukaan. Kolmannen mallin avulla esiin saatuja eroja ei voitu kuitenkaan enää pitää kovin merkittävänä johtuen mm. mallia selittävien latausten pienestä lukumäärästä. Apilanäytteelle suoritettu siitepölymääritys ja aistinvarainen arviointi tukivat näytteen apila-alkuperää, joten menetelmä avulla ei pystytty erottamaan apilahunajaa muista lajihunajista. Tattarihunajanäytteille tehdyt esitutkimukset viittasivat siihen, että näytteet eivät olleet aivan puhdasta tattarihunajaa. Tämä voi selittää, miksi näytteiden sijoittumisessa näkyi pientä hajontaa kaikissa PCA-malleissa eivätkä tattarihunajanäytteet juuri eronneet mallien pääjoukoista. Lisäksi yksi tattarinäyte muistutti PCA:n perusteella hiilihydraattiprofiililtaan enemmän horsma- kuin tattarihunajaa.

Kanervahunajanäytteiden esitutkimukset tukivat näytteiden kanerva-alkuperää, vaikka näytteiden siitepölymäärissä oli suuria eroja. Myös näytteiden melko lähekkäinen sijoittuminen PCA:ssa tuki niiden alkuperää. Voikukkanäytteille suoritettut siitepölyanalyysit ja aistinvaraiset arvioinnit eivät täysin tukeneet näytteiden merkittyä alkuperää. Tämä voi selittää, miksi voikukkanäytteet eivät PCA:ssa muodostaneet täysin selkeää yhtenäistä joukkoa. Sekakukkahunajat olivat esitutkimusten perusteella selkeitä sekahunajia, mikä selittää hyvin, miksi näytteiden hiilihydraattiprofiileista ei löydetty erityisiä muista lajihunajista erottavia piirteitä. Hieman yllättävänä voidaan pitää kuitenkin sitä, että sekahunajanäytteiden hiilihydraattiprofiilit olivat kolmen näytteen osalta PCA:ssa hyvinkin samanlaisia eivätkä näytteet sijoittuneet ympäri mallia.

Suurin hajonta PCA:ssa oli puolukkahunajanäytteillä, joilla ei näyttänyt olevan minkäänlaista yhtenäisyyttä niiden hiilihydraattiprofiileissa. Puolukkahunajille suoritettut siitepölyanalyysit ja aistinvaraiset arvioinnit voivat kuitenkin selittää tätä näytteiden sijoittumista PCA-malleissa. Vaikka näytteistä lasketut puolukan siitepölyhiukkasten määrät olivat melko suuria, oli näytteissä aistinvaraisen arvioinnin perusteella kuitenkin melko vähän puolukkahunajalle tyypillisiä piirteitä. Näytteiden suuri hajonta PCA-malleissa saattaa siis selittyä sillä, että näytteet eivät olleet puhtaita puolukkahunajia, eikä niillä tämän vuoksi myöskään ollut yhteneviä hiilihydraattiprofiileja.

Eri lajihunajista tutkittujen näytteiden lukumäärä oli lopulta melko pieni. Osa syynä oli se, että vuoden 2016 kesä oli Suomessa hunajan tuotannon kannalta huono, mikä näkyi myös kyseisen vuoden Suomen paras hunaja -kilpailussa normaalia pienempänä osallistujamääränä. Lisäksi suurin osa Suomessa tuotetusta hunajasta on sekakukkahunajaa ja lajihunajien tuotanto on usein hyvin pienimuotoista toimintaa, joka vaatii lajihunajien tuottajilta paljon lisätyötä sekä laajaa tietämystä mehiläisistä ja niiden ravinto-käyttäytymisestä (Salonen 2011). Tämän vuoksi kotimaisten lajihunajien systemaattinen näytteenkeruu voi olla haastavaa. Lisäksi ulkomaisten lajihunajien käyttäminen saattaisi vain lisätä näytteiden välistä varianssia erilaisista kasvu- ja tuotanto-olosuhteista johtuen. Niissä lajihunajissa, joista tutkittavana oli useampia yksittäisiä näytteitä, oli havaittavissa paikoin suurtakin vaihtelua näytteiden hiilihydraattiprofiileissa. Tämä myös näkyi näytteiden hajontajana PCA-malleissa. Jotta kullekin lajihunajalle tyypillistä hiilihydraattiprofiilia voitaisiin määrittää tarkemmin, tulisi tutkittavien näytteiden lukumäärän olla huomattavasti suurempi, jotta yksittäisten näytteiden aiheuttama vaihtelu tuloksissa ei olisi niin merkittävää.

3.4.7 Vertailu muihin tutkimuksiin

Verrattaessa tässä työssä kehitettyä menetelmää muihin hunajan hiilihydraattien tutkimiseen käytettyihin menetelmiin voidaan menetelmän toimintaan olla melko tyytyväisiä. Esimerkiksi Nozalin ym. (2005) kehittämässä HPAEC-PAD-menetelmässä maltoosin retentioaika oli yli 40 minuuttia, mikä oli huomattavasti suurempi kuin tässä työssä (n. 17 minuuttia). Menetelmän avulla pystyttiin erottamaan 14 eri hiilihydraattistandardia, mikä oli vain hieman enemmän kuin tähän työhön kehitetyssä menetelmässä. Myös Cotten ym. (2003) kehittämässä GC-menetelmässä kaikkien tutkittujen hiilihydraattien eluutioon kulunut aika oli huomattavasti suurempi kuin tämän

työn menetelmässä. Menetelmällä analysoitujen hiilihydraattien määrä oli hieman suurempi kuin tässä työssä, mutta toisaalta kaikkien hiilihydraattien resoluutio ei menetelmällä ollut täydellistä. Moran ja Mariolin (2001) kehittämässä menetelmässä hiilihydraattien eluutioon kulunut aika oli lähes sama kuin tässä työssä. Toisaalta tutkimuksessa mukana olleiden hiilihydraattien määrä oli huomattavasti pienempi, joten menetelmiä ei tämän vuoksi voida suoraan vertailla keskenään. Rohrerin ym. (2016) kehittämässä menetelmässä yhdisteiden retentioajat olivat myös hyvin pieniä, minkä lisäksi menetelmässä ei ilmennyt tämän työn menetelmässä ongelmaksi muodostunutta fruktoosin eluution jälkeistä pohjaviivan nousua. Resoluution sekä hiilihydraattien analysoimiseen kuluneen ajan perusteella tässä työssä käytetyn menetelmän suorituskyky oli hyvä verrattuna muissa tutkimuksissa käytettyihin menetelmiin. Etenkin pienellä lisäoptimoinnilla ja kolonnin jälkeisellä NaOH-lisäyksellä olisi vielä mahdollista parantaa menetelmän resoluutiota sekä mahdollisesti fruktoosin jälkeinen pohjaviivan nousu olisi mahdollista välttää. Myös kolonnin kunnostamiseen käytetty välitasapainotus saattaisi jäädä tällöin tarpeettomaksi, mikä lyhentäisi kokonaisanalyysiaikaa merkittävästi.

Tässä työssä hiilihydraattien välisiä eroja esille tuoneet tekijät poikkesivat osittain aiemmissa tutkimuksissa havaituista tekijöistä. Esimerkiksi Cotten ym. (2004) erottavaksi tekijäksi havaitsemaa fruktoosi-glukoosisuhdetta ei pystytty täysin hyödyntämään tässä työssä johtuen fruktoosin määrittämiseen liittyneistä ongelmista. Myös meletsitoosi on ollut monessa tutkimuksessa yksi merkittävimmistä eri lajihunajien välille eroa tuoneista hiilihydraateista (Weston ja Brocklebank 1999; Nozal ym. 2005; De la Fuente ym. 2011). Tässä työssä käytetyssä menetelmässä olleet ongelmat isomaltoosin ja meletsitoosin välisessä resoluutiossa vähensivät hiilihydraattiprofiilien luomiseen käytössä olleen aineiston monipuolisuutta, sillä meletsitoosin avulla olisi todennäköisesti voitu löytää lisää eroja tutkittujen lajihunajien hiilihydraattiprofiilien välille. Myös sakkaroosipitoisuuden on havaittu tutkimuksissa olevan eroa tuova tekijä eri lajihunajien välillä (Weston ja Brocklebank 1999; Cotte ym. 2003). Tämän vuoksi menetelmän sopimattomuus sakkaroosin määrittämiseen esti mahdollisten sakkaroosipitoisuuserojen hyödyntämisen lajihunajien erottamisessa.

Sakkaroosin avulla olisi myös mahdollista havaita sakkaroosi- tai sokerisiirappilisäys hunajassa, sillä suuret sakkaroosipitoisuudet hunajassa ovat lähes aina merkki jonkinlaisesta väärennöksestä (Siddiqui ym. 2017). Näin menetelmää olisi mahdollisesti voitu käyttää sekä hunajan botaanisen alkuperän määrittämiseen että hunajaväärennösten tutkimiseen. Sakkaroosin avulla olisi kuitenkin mahdollista tutkia vain kaikkien

yksinkertaisimpia väärennöksiä, sillä myös pidempiketjuisten oligosakkaridien määrittäminen saattaa olla tarpeen väärennösten havaitsemiseksi. Esimerkiksi Wangin ym. (2015) menetelmässä siirappien avulla tapahtuva väärentäminen havaittiin vasta yli 5 DP:n olevien oligosakkaridien avulla. Morales ym. (2008) havaitsivat, että siirappilisäysten havaitseminen vaatii vielä pidempiketjuisten oligosakkaridien (DP 8–16) määrittämistä näytteistä. Näin tutkittavien hiilihydraattistandardien määrää tulisi lisätä merkittävästi, mikäli menetelmän avulla haluttaisiin tutkia laajemmin myös hunajaväärennöksiä. Pitkäketjuisten oligosakkaridien analysoiminen vaatisi todennäköisesti myös niiden määrittämiseen paremmin soveltuvan kolonnin (esim. CarboPac PA100) käyttämistä (Corradini ym. 2012; Rohrer 2013). Pelkkä hiilihydraattistandardien määrän lisääminen nykyiseen menetelmään ei siis välttämättä riitä kaikkien väärennösten tutkimiseksi.

Jokaisesta tutkitusta näytteestä löytynyt fusitoli oli tekijä, jonka esiintyvyyttä hunajassa ei tätä ennen ollut juurikaan havaittu. Myöskään fukoosin roolia hunajan hiilihydraattiprofiilissa ei ollut juurikaan tätä ennen tutkittu, vaikka se tässä työssä tehtyjen mittausten perusteella oli monessa eri lajihunajassa esiintyvä hiilihydraatti. Lisäksi fusitoli-fukoosisuhteen havaittiin mahdollisesti olevan lajihunajia erottava tekijä. Tulevaisuudessa tehtäviin hiilihydraattiprofiilitutkimuksiin fusitolin ja fukoosin lisääminen tutkittavien hiilihydraattien joukkoon voi olla hyödyllinen lisä yritettäessä löytää eroja eri lajihunajien välillä.

Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten vertailu muissa tutkimuksissa saatuihin tuloksiin on haasteellista, sillä suurin osa hunajan hiilihydraattiprofiilia koskevista tutkimuksista on tehty ulkomaisille hunajille, jolloin maantieteelliset vaikutukset hunajanäytteiden hiilihydraattiprofiileihin tulee ottaa huomioon tulosten vertailussa. Vain muutamassa tutkimuksessa on tutkittu suomalaisissa lajihunajissa esiintyviä hiilihydraatteja. Anneli Salosen (2011) väitöskirjassa osa tutkituista lajihunajista oli samoja kuin tässä työssä mukana olleet lajihunajat. Väitöskirjassa esitettyjen tulosten perusteella hunajan hiilihydraattiprofiilia ei pidetty hyödyllisenä tekijänä määrittämään hunajan botaanista alkuperää. Kuitenkin tässä työssä luotujen hiilihydraattiprofiilien perusteella pystyttiin löytämään selkeitäkin eroja eri lajihunajien välillä. Merkittävin ero Salosen väitöskirjan ja tämän tutkimuksen välillä oli hiilihydraattien analysoimiseen käytetyssä menetelmässä, sillä HPAEC-PAD-menetelmällä pystyttiin määrittämään hunajanäytteistä huomattavasti pienempiä hiilihydraattipitoisuuksia verrattuna Salosen käyttämään HPLC-RI-tekniikkaan. Näin myös pienemmissä pitoisuuksissa esiintyneiden hiilihydraattien välisiä pitoisuuseroja pystyttiin hyödyntämään lajihunajien välisten erojen löytämiseksi. HPAEC-PAD-

tekniikkaa tai muita vastaavaan herkkyyteen yltäviä tekniikoita voidaan siis pitää välttämättömyytenä määritettäessä hunajan hiilihydraattiprofiileita, jotta myös pienemmissä pitoisuuksissa esiintyvien hiilihydraattien vaikutus saadaan selvitettyä.

Myös Kortnesniemen ym. (2016) tutkimuksessa tutkittiin suomalaisten lajihunajien hiilihydraattiprofiileja, jolloin maantieteellisten erojen vaikutusta tuloksien vertailussa ei voida pitää merkittävänä tekijänä. Tutkimuksessa saatiin tässä työssä eronneiden mesikaste-, hilla- ja lehmushunajien lisäksi erotettua myös mm. puolukka-, kanerva- ja tattarihunajat joiden erottaminen ei tämän työn PCA-mallien avulla onnistunut. Meletsitoosin, glukoosin, fruktoosin ja trehaloosin havaittiin olevan tärkeimmät lajihunajia erottavat hiilihydraatit. Tässä työssä glukoosin ja fruktoosin ei havaittu olevan lajihunajien erottamisen kannalta kriittisiä hiilihydraatteja, mikä saattoi osittain johtua fruktoosin määrittämiseen liittyneistä ongelmista. Lisäksi meletsitoosin vaikutusta ei pystytty tässä työssä arvioimaan, jolloin hiilihydraatin vaikutuksen vertailu valitettavasti ei ollut mahdollista. Toisaalta eri lajihunajien trehaloosipitoisuuksien havaittiin myös tässä työssä tuovan selkeitä eroja niiden välille. Kortnesniemen ym. (2016) tutkimuksessa mukana oli hiilihydraattien lisäksi myös muita näytteistä mitattuja yhdisteitä, joiden avulla lajihunajia pystyttiin karakterisoimaan useamman tekijän avulla. Tämä tukee ajatusta, että pelkästään hunajan hiilihydraattiprofiilin avulla on vaikea määrittää hunajan botaanista alkuperää ja luotettavien tulosten saamiseksi tarvitaan myös muita analyysijä.

Goodallin ym. (1995) saamat tulokset muistuttivat hyvin paljon tässä työssä saatuja tuloksia, vaikka tutkimuksessa mukana olleet lajihunajat eivät olleetkaan täysin samoja. Tutkimuksessa luodulle monimuuttujamallille oli tyypillistä, että muutama lajihunaja saatiin selkeästi erotettua, mutta muut lajihunajat muodostivat pääjoukon, josta erojen löytäminen oli vaikeampaa. Ouchemoukh ym. (2010) pystyivät tutkimuksessaan erottamaan vain yhden neljästä tutkitusta lajihunajasta, mikä oli huomattavasti vähemmän kuin tässä työssä käytetyllä menetelmällä. Cotte ym. (2004) kehittämässä PCA-mallissa samaa lajihunajaa olevat näytteet muodostivat melko yhtenäisiä ryhmiä, vaikka kaikkien ryhmien väliset erot eivät olleet täysin selkeitä. Toisaalta tähän työhön verrattaessa tutkimuksessa mukana olleiden näytteiden lukumäärä oli moninkertainen ja eri lajihunajien määrä pienempi, mikä vähensi lajihunajien sisäistä varianssia ja saattoi edesauttaa selkeämpien joukkojen muodostumista.

De la Fuenten ym. (2011) tutkimuksessa ei pystytty löytämään tarpeeksi selkeitä eroja lajihunajien hiilihydraattiprofiilien väliltä johtuen lajien sisäisen varianssin suuruudesta. Myös tässä työssä suoritettussa tutkimuksessa oli havaittavissa paikoin suurtakin vaihtelua

samaa lajia olleiden hunajanäytteiden kesken, mikä tukee De la Fuenten ym. (2011) havaintoja. Sisäisen vaihtelun syy voi osittain olla lajihunajien määrittelyssä, koska hunajan kutsuminen lajihunajaksi vaatii, että vähintään 45 % medestä on peräisin vain yhdestä kasvilajista (Salonen 2011). Tämä jättää paljon varaa myös muista kasveista olevalle medelle, mikä voi lisätä merkittävästi samaa lajihunajaa olevien näytteiden hiilihydraattiprofiilien välistä vaihtelua. Myös mehiläisten taipumus kerätä mettä useista eri kasvilähteistä tekee lajihunajan tuotannosta hyvin vaikeasti säädeltävää, koska mehiläisten pakottaminen keräämään mettä vain tietyistä kasveista on käytännössä mahdotonta. Yksittäisten hiilihydraattien esiintyvyyden avulla tapahtuvaa lajihunajien tunnistamista pidettiin De la Fuenten ym. (2011) tutkimuksessa toimivampana menetelmänä kuin koko hiilihydraattiprofiilin avulla tapahtuvaa tunnistamista. Myös tässä työssä tiettyjen hiilihydraattien esiintyvyyden sekä osittain hiilihydraattien välisten suhteiden havaittiin olevan joillekin lajihunajille tyypillisiä ominaisuuksia, jolloin näiden tekijöiden avulla voidaan pyrkiä lajihunajien karakterisointiin. Kun tähän lisätään myös muita näytteille tehtäviä erilaisia määrittäyksiä, voidaan lajihunajien luokittelun luotettavuutta parantaa merkittävästi.

4 PÄÄTELMÄT

Tutkimuksessa kehitetyn menetelmän avulla pystyttiin melko hyvin määrittämään eri lajihunajille niiden hiilihydraattiprofiilit. Suurimmat menetelmässä ilmenneet ongelmat liittyivät fruktoosin ja turanoosin määrittämiseen näytteistä. Menetelmän jatkokehityksellä voidaan näiden hiilihydraattien määrittäminen saada vakaammaksi, jolloin myös fruktoosin ja turanoosin vaikutusta lajihunajien välisiin eroihin pystytään paremmin tutkimaan. Lisäksi isomaltoosin ja meletsitoosin sekä kojibioosin ja 1-kestoosin välisten resoluutioiden parantamisella saataisiin merkittävästi lisättyä hiilihydraattiprofiileihin vaikuttavien tekijöiden määrää menetelmässä. Myös β -gentiobioosin yhteydessä esiintyneen tuntemattoman piikin tunnistaminen ja erottaminen β -gentiobioosista parantaisi menetelmän toimivuutta. Kolonnin jälkeisen NaOH-lisäyksen avulla pystyttäisiin mahdollisesti parantamaan näitä yhdisteiden resoluutioissa havaittuja ongelmia ja mahdollisesti myös ehkäisemään fruktoosin eluution jälkeen tapahtunutta pohjaviivan nousua kromatogrammissa.

Kehitetyn menetelmän avulla määritettyjen hiilihydraattiprofiilien perusteella pystyttiin erottamaan mesikastehunaja muista tutkimuksessa mukana olleista lajihunajista. Menetelmän PCA-mallien avulla olisi siis mahdollista tunnistaa mesikastehunajaksi ilmoitetut hunajanäytteet. Kukkaishunajista jättipalsami-, horsma-, ja hillahunajat näyttivät omaavan yksilölliset hiilihydraattiprofiilit, joiden avulla myös nämä lajihunajat olisi mahdollista tunnistaa ja erottaa muista lajihunajista. Kaikkien kukkaishunajien luotettavaa tunnistamista menetelmän avulla ei kuitenkaan voitu täysin varmistaa. Menetelmän PCA-mallien avulla voitaisiin karkeasti arvioida tuntemattoman kukkaishunajanäytteen alkuperää, mutta täysin luotettavaa tunnistamista ei menetelmällä pystytä suorittamaan.

Tutkimuksessa mukana olleiden näytteiden lukumäärä oli melko pieni. Lisäksi jo käytössä olleiden näytteiden määrällä oli havaittavissa eroja samaa botaanista alkuperää olevien lajihunajien hiilihydraattiprofiileissa. Kerätyn aineiston perusteella ei siis vielä voida tehdä vahvoja johtopäätöksiä selkeistä eri lajihunajien hiilihydraattiprofiilien välisistä eroista. Tämän vuoksi jatkotutkimuksiin tarvitaan suurempi määrä näytteitä, jotta pystytään suuremmalla varmuudella määrittämään lajihunajille tyypilliset hiilihydraattiprofiilit. Samalla pystytään paremmin luomaan sellaisia monimuuttujamalleja, joiden avulla nämä hiilihydraattiprofiilit pystytään luotettavasti erottamaan toisistaan.

LÄHDELUETTELO

Agila A, Barringer S. 2013. Effect of adulteration versus storage on volatiles in unifloral honeys from different floral sources and locations. *J Food Sci* 78(2):C184-91.

Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA, Hannan MA. 2014. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *J Saudi Chem Soc* 18(5):618-25.

Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, González-Paramás AM, Damiani E, Astolfi P, Martinez-Sanchez G, Bompadre S, Quiles JL, Santos-Buelga C, Battino M. 2012. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem Toxicol* 50(5):1508-16.

Aries E, Burton J, Carrasco L, De Rudder O, Maquet A. 2016. Scientific support to the implementation of a Coordinated Control Plan with a view to establishing the prevalence of fraudulent practices in the marketing of honey. JRC Technical Report JRC104749. 38 s.

Belitz H, Grosch W, Schieberle P. 2004. Food chemistry. 3 p. Berlin: Springer. 1070 s.

Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Pless M. 2010. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *J Agr Food Chem* 58(15):8495-501.

Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35(1):4-17.

- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr* 27(6):677-89.
- Bradbear N. 2009. Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Non-Wood Forest Products*. 19 p. Rome, Italy: FAO. 194 s.
- Cavia MM, Fernández-Muiño MA, Alonso-Torre SR, Huidobro JF, Sancho MT. 2007. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chem* 100(4):1728-33.
- CHROMacademy. 2017. The theory of HPLC: chromatographic parameters. Saatavilla: http://www.chromacademy.com/lms/sco2/Theory_Of_HPLC_Chromatographic_Parameters.pdf. Tulostettu: 7.11.2017.
- Chua L, Adnan N. 2014. Biochemical and nutritional components of selected honey samples. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 13(2):169-79.
- Codex Alimentarius. 2001. Revised Codex Standard for Honey. (No. CODEX STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001)). Codex Stand 12:1-7.
- Consonni R, Cagliani LR, Cogliati C. 2012. NMR characterization of saccharides in italian honeys of different floral sources. *J Agric Food Chem* 60(18):4526-34.
- Cordella C, Militão JSLT, Clément M, Drajnudel P, Cabrol-Bass D. 2005. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Anal Chim Acta* 531(2):239-48.
- Corradini C, Cavazza A, Bignardi C. 2012. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *Int J Carbohyd Chem* 2012:1-13.
- Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot M. 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J Chromatogr A* 1021(1):145-55.
- Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot M. 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Anal Bioanal Chem* 380(4):698-705.
- Cotte JF, Casabianca H, Lheritier J, Perrucchietti C, Sanglar C, Waton H, Grenier-Loustalot MF. 2007. Study and validity of ¹³C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ²H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Anal Chim Acta* 582(1):125-36.
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* 196:309-23.
- Davies A, Fearn T. 2005. Back to basics: the principles of principal component analysis. *Spectrosc Eur* 16(6):20-3.
- De la Fuente E, Ruiz-Matute AI, Valencia-Barrera RM, Sanz J, Martinez Castro I. 2011. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chem* 129(4):1483-9.
- De Souza-Kruliski CR, Ducatti C, Filho WGV, Orsi RdO, Silva ET. 2010. A study of adulteration in Brazilian honeys by carbon isotope ratio. *Cienc Agrotec* 34(2):434-9.
- Di Girolamo F, D'Amato A, Righetti PG. 2012. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *J Proteomics* 75(12):3688-93.

- Escuredo O, Fernández-González M, Seijo MC. 2012. Differentiation of Blossom Honey and Honeydew Honey from Northwest Spain. *Agriculture* 2(1):25-37.
- Escuredo O, Dobre I, Fernández-González M, Seijo MC. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem* 149:84-90.
- Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi (EY) N:o 2001/110. 2002. Euroopan yhteisöjen virallinen lehti 45(10):47-53.
- Fei X, Wu B, Shen C, Zhang R, Ding T, Li L. 2012. Determination of exogenous gamma-amylase residue in honey. *Chinese J Chrom* 30(8):777-81.
- Folkes D, Jordan M. 2006. Mono- and Disaccharides: Analytical Aspects. Teoksessa: Eliasson, A, toim. Carbohydrates in food. 2 p. Boca Raton, FL, USA: CRC/Taylor & Francis. s 1-40.
- Gámbaro A, Ares G, Giménez A, Pahor S. 2007. Preference mapping of color of Uruguayan honeys. *J Sens Stud* 22(5):507-19.
- Ghorbani M, Khajehroshanaee N. 2009. The study of qualitative factors influencing on honey consumers demand: application of hedonic pricing model in Khorasan Razavi province. *J Appl Sci* 9:1597-600.
- Goodall I, Dennis MJ, Parker I, Sharman M. 1995. Contribution of high-performance liquid chromatographic analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey. *J Chromatogr A* 706(1-2):353-9.
- Guler A, Kocaokutgen H, Garipoglu AV, Onder H, Ekinici D, Biyik S. 2014. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chem* 155:155-60.
- Iglesias MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC, de Lorenzo C, González M, Pueyo E. 2006. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *J Agric Food Chem* 54(24):9099-104.
- Jandrić Z, Haughey SA, Frew RD, McComb K, Galvin-King P, Elliott CT, Cannavan A. 2015. Discrimination of honey of different floral origins by a combination of various chemical parameters. *Food Chem* 189:52-9.
- Kalábová K, Vorlová L, Borkovcová I, Smutná M, Večerek V. 2003. Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech J Animal Sci* 48(12):551-7.
- Kaškonienė V, Venskutonis PR, Čeksterytė V. 2010. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT-Food Sci Technol* 43(5):801-7.
- Kortesniemi M, Slupsky CM, Ollikka T, Kauko L, Spevacek AR, Sjövall O, Yang B, Kallio H. 2016. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Res Int* 86:83-92.
- LaCourse WR, Johnson DC. 1993. Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection of carbohydrates based on pulsed voltammetry. *Anal Chem* 65(1):50-5.
- Li S, Shan Y, Zhu X, Zhang X, Ling G. 2012. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *J Food Compos Anal* 28(1):69-74.
- Mäkinen KK. 1994. Sugar Alcohols. Teoksessa: Goldberg, I, toim. Functional Foods. 1. p. Boston, MA: Springer. s. 219-41.
- Megherbi M, Herbreteau B, Faure R, Salvador A. 2009. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey. *J Agr Food Chem* 57(6):2105-11.
- Mora MI, Marioli JM. 2001. Honey carbohydrate analysis by HPLC, with electrochemical detection, using a NI-CR alloy electrode. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 24(5):711-20.

- Morales V, Corzo N, Sanz ML. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chem* 107(2):922-8.
- Moreira RFA, De Maria CAB, Pietroluongo M, Trugo LC. 2010. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem* 121(3):697-704.
- Negueruela A, Perez-Arquillue C. 2000. Color measurement of rosemary honey in the solid state by reflectance spectroscopy with black background. *J AOAC Int* 38(8):669-74.
- Nozal Nalda MJ, Yagüe Bernal JL, Diego Calva JC, Martín Gómez MT. 2005. Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Anal Bioanal Chem* 382(2):311-9.
- Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Alamo M, Diego JC, Tapia J. 2005. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *J Agric Food Chem* 53(8):3095-100.
- Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bachir Bey M, Djoudad-Kadji H, Louaileche H. 2010. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry* 121(2):561-8.
- Pastell H. 2010. Preparation, structural analysis and prebiotic potential of arabinoxylo-oligosaccharides [väitöskirja]. EKT-sarja 1463. Helsinki: University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 112 s. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-6055-7>.
- Persano Oddo L, Bogdanov S. 2004. Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie* 35:2-3.
- Persano Oddo L, Piana L, Bogdanov S, Bentabol A, Gotsiou P, Kerkvliet J, Martin P, Morlot M, Ortiz Valbuena A, Ruoff K, von der Ohe K. 2004. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie* 35:82-93.
- Persano Oddo L, Piazza MG, Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie* 30(1):57-65.
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT. 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Bonn, Saksa: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. 552 s.
- Puusepp L, Koff T. 2014. Pollen analysis of honey from the Baltic region, Estonia. *Grana* 53(1):54-61.
- Rohrer J. 2013. Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). Thermo Fisher Scientific, Technical Note 20. 12 s.
- Rohrer J, Patil S, Thayer J, Yang H. 2016. Direct mono- and disaccharide determinations in foods and beverages. *Chrom Today* 9(2):14-7.
- Rorabacher DB. 1991. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. *Anal Chem* 63(2):139-46.
- Ruiz-Matute A, Soria A, Martínez-Castro I, Sanz M. 2007. A new methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups. *J Agr Food Chem* 55(18):7264-9.
- Rybak-Chmielewska H. 2007. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. *J Apic Sci* 51(1):39-47.
- Sahinler S, Sahinler N, Gul A. 2009. Determination of honey botanical origin by using discriminant analysis. *J Anim Vet Adv* 8(3):488-91.
- Salonen A. 2011. Boreal unifloral honeys: Screening of composition and properties [väitöskirja]. Publications of the University of Eastern Finland Dissertations in Forestry and Natural Sciences 51. 65 s.

- Salonen A, Virjamo V, Tammela P, Fauch L, Julkunen-Tiitto R. 2017. Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chem* 237:214-24.
- Siddiqui AJ, Musharraf SG, Choudhary MI, Rahman A. 2017. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chem* 217:687-98.
- [SML] Suomen Mehiläishoitajain Liitto ry. 2017. Hunajan laatuvaatimukset. Saatavilla: <http://www.mehilaishoitajat.fi/mehilaishoitajille/hyvaa-suomesta-merkki/hunajan-laatuvaatimukset/>. Tulostettu: 24.8.2017.
- Swallow KW, Low NH. 1990. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *J Agr Food Chem* 38(9):1828-32.
- Thermo Fisher Scientific. 2013. Dionex Carbpac PA1 column product manual. Saatavilla: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-065547-CarboPac-PA1-Column-Man065547-EN.pdf>. Tulostettu: 14.12.2017.
- Tornuk F, Karaman S, Ozturk I, Toker OS, Tastemur B, Sagdic O, Dogan M, Kayacier A. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Ind Crop Prod* 46:124-31.
- Tuberoso CIG, Jerković I, Sarais G, Congiu F, Marijanović Z, Kuš PM. 2014. Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE L*a*b* chromaticity coordinates. *Food Chem* 145:284-91.
- Von der Ohe W, Dustmann J, von der Ohe K. 1991. Prolin als kriterium der reifes des honigs. *Deut Lebensm-Rundsch* 87:383-6.
- Von Der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 35(1):18-25.
- Wang J, Li QX. 2011. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv Food Nutr Res* 62:89-137.
- Wang S, Guo Q, Wang L, Lin L, Shi H, Cao H, Cao B. 2015. Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. *Food Chem* 172:669-74.
- Weston RJ, Brocklebank LK. 1999. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chem* 64(1):33-7.
- Záborská B, Vorlová L. 2015. Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Vet Brno* 83:85-102.